

Université de Montréal

Expression et caractérisation du récepteur hypophysaire de rat du facteur de libération de l'hormone de croissance ainsi que de ses isoformes.

Par

Luc Pomerleau

Programmes de Biologie Moléculaire

Faculté des Études Supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences  
en biologie moléculaire

juillet, 2003

© Luc Pomerleau, 2003



QH  
506  
U54  
2003  
n. 007

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Expression et caractérisation du récepteur hypophysaire de rat du facteur de  
libération de l'hormone de croissance ainsi que de ses isoformes.

Présenté par :  
Luc Pomerleau

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

D<sup>r</sup> Marc Prentki  
Président-rapporteur

D<sup>r</sup> Pierrette Gaudreau  
Directrice de recherche

D<sup>r</sup> Serge St-Pierre  
Membre du Jury

## I. RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS FRANÇAIS

La sécrétion d'hormone de croissance (GH) est contrôlée dans l'hypophyse antérieure par deux peptides hypothalamiques: le facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH) et la somatostatine. Elle est initiée par la liaison du GHRH à son récepteur membranaire (GHRH-R), localisé au niveau des cellules somatotropes. Ce récepteur a été cloné dans l'hypophyse de plusieurs mammifères incluant l'humain, le rat, la souris, le porc, le bœuf et le mouton, ainsi que dans des tumeurs hypophysaires humaines. Il fait partie de la sous-famille B-III des récepteurs couplés aux protéines G. Trois formes du GHRH-R ont été décrites dans l'hypophyse de rat: une forme de 423 acides aminés (aa) qui constitue un récepteur fonctionnel et à haute affinité pour le GHRH (récepteur natif), une isoforme de 464 aa identique à l'isoforme de 423 aa, mais possédant une insertion de 41 aa au niveau de la troisième boucle intracytoplasmique et une dernière isoforme identique à celle de 464 aa mais comportant une délétion des 5 derniers aa et une addition de 17 aa en C-terminal.

Bien qu'il soit rapporté dans la littérature que la forme de 423 aa est la plus abondante dans l'hypophyse de rat, le profil de structure-affinité global connu équivaut à celui des trois formes du GHRH-R. Afin d'étudier le profil d'affinité et la fonctionnalité individuel de la forme native de 423 aa du GHRH-R de rat (rGHRH-R), des conditions d'expression ont été mises au point. Elles ont consisté en l'expression par transfection stable de l'ADNc de ce récepteur dans

le plasmide Zem219b (promoteur inductible par le zinc), dans la lignée cellulaire BHK 570. Les cellules transfectées ont également subi une carence en sérum de 4 h avant leur prélèvement pour l'essai de liaison. Des niveaux d'expression adéquats de la forme native de 423 aa ainsi qu'une fonctionnalité ont été démontrés par essai de liaison, à l'aide du [ $^{125}$ I-Tyr<sup>10</sup>]hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub> ( $K_d$ ,  $B_{max}$ ) et du [N<sup>α</sup>-5-carboxyfluoresceinyl-D-Ala<sup>2</sup>, Ala<sup>8</sup>, Ala<sup>15</sup>, Lys<sup>22</sup>]hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> (cinétique et mécanisme d'internalisation). Une étude de structure-affinité avec des analogues Ala- et D-monosubstitués du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> a permis d'identifier le profil pharmacologique de la forme native de 423 aa du rGHRH-R. Ainsi, les résidus Tyr<sup>1</sup>, Asp<sup>3</sup>, Phe<sup>6</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Arg<sup>11</sup>, Lys<sup>12</sup>, Leu<sup>14</sup>, Leu<sup>17</sup>, Arg<sup>20</sup> et Lys<sup>21</sup> seraient impliqués dans la liaison du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> au récepteur natif alors que les résidus Val<sup>13</sup> et Ala<sup>19</sup> seraient impliqués dans la liaison, en plus du maintien d'une conformation optimale du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>, assurant une liaison à haute affinité au rGHRH-R natif. Par ailleurs, les conditions d'expression mises au point pour la forme native du rGHRH-R ne se sont pas avérées optimales pour l'expression des deux isoformes de ce récepteur. Les stratégies exploitées pour l'optimisation de leur expression ont impliqué l'utilisation de concentrations plus élevées de zinc (20  $\mu$ M au lieu de 3.8  $\mu$ M) pour la culture cellulaire, augmentant le taux de transcription des isoformes et l'utilisation d'un homogénat, au lieu d'une préparation membranaire, pour les essais de liaison.

Globalement, cette étude a permis un développement méthodologique important concernant les conditions d'expression du rGHRH-R et de ses

isoformes. De plus, elle a permis de mieux comprendre la réponse de la cellule somatotrope au GHRH. Des évidences indiquent que dans certaines situations physiopathologiques tel le vieillissement ou certaines formes de cancers, les isoformes du GHRH-R pourraient exercer un rôle plus important dans la réponse au GHRH. Les études de structure-affinité à l'aide de la forme native du rGHRH-R et de ces isoformes contribueront à la mise au point d'agonistes et/ou d'antagonistes sélectifs des différentes formes du GHRH-R en fonction de leur contribution à ces situations physiopathologiques.

**Mots clés :** facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH), GHRH-récepteur, système d'expression, isoformes, essai de liaison, imagerie cellulaire, étude de structure-affinité.

## II. RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS ANGLAIS

Growth hormone secretion (GH) is controlled in the anterior pituitary by two hypothalamic peptides : growth hormone-releasing hormone (GHRH) and somatostatin. GH secretion is initiated by the binding of GHRH to his receptor (GHRH-R), localized on somatotroph cells. This receptor was cloned in the pituitary of several mammals including human, rat, mouse, pig, beef and sheep, as well as in human pituitary tumors. It belongs to the G-protein-coupled receptor B-III family. Three forms of the GHRH-R were described in rat pituitary : a 423 amino acids (aa) form, being a functional receptor with high affinity for GHRH (native form), a 464 aa isoform exhibiting the same aa sequence as the 423 aa form but possessing a 41 aa insertion in the third intracytoplasmic loop, and a 480 aa isoform having the same aa sequence as the 464 aa form, with a deletion of its 5 last aa and a C-terminal addition of 17 aa. Little information exists on the role of these two isoforms under in physiological or pathological conditions.

To study the affinity profile and functionality of the 423 aa native form of the rat GHRH-R (rGHRH-R), expression conditions were developed. A stable transfection of the rGHRH-R cDNA in the Zem219b vector (inducible promoter by zinc) in the BHK 570 cell line was used, with a serum deprivation of the transfected cells, 4 hs collecting cells for the binding assay. Desired expression levels and functionality of the 423 aa native form were demonstrated by binding assay with the [ $^{125}$ I-Tyr $^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH $_2$  ( $K_d$ ,  $B_{max}$ ) and the [N $^{\alpha}$ -5-carboxyfluoresceinyl-D-Ala $^2$ , Ala $^8$ , Ala $^{15}$ , Lys $^{22}$ ]hGHRH(1-29)NH $_2$  (kinetics and mechanism of internalization). A structure-affinity study with hGHRH(1-29)NH $_2$



analogues in which aa were substituted by Ala- or D-aa, allowed to identify the pharmacological profile of the rGHRH-R native form. Thus, Tyr<sup>1</sup>, Asp<sup>3</sup>, Phe<sup>6</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Arg<sup>11</sup>, Lys<sup>12</sup>, Leu<sup>14</sup>, Leu<sup>17</sup>, Arg<sup>20</sup> and Lys<sup>21</sup> residues were shown to be involved in hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> binding to the native receptor, while Val<sup>13</sup> and Ala<sup>19</sup> residues were shown to be involved in binding and maintenance of hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> optimal conformation to allow high affinity binding to the native rGHRH-R. Expression conditions used for the native rGHRH-R form were not adequate for an optimal expression of the two rGHRH-R isoforms. Optimization strategies of the expression implied the use of higher concentrations of zinc (20 µM instead of 3.8 µM) in cell culture, increasing the rate of isoforms transcription, as well as the use of homogenate, instead of membrane preparation, for the binding assay.

Altogether, this study allows an important methodological development related to the expression conditions of rGHRH-R and its isoforms. Moreover, this work has allowed a better understanding of the somatotroph response to GHRH. Evidence indicate that in certain physiological conditions such as aging or cancer, GHRH-R isoforms could play a more important role in GHRH response. Structure-affinity studies on the rGHRH-R native form and possibly on its isoforms will allow to design selective agonists or antagonists targetting one or more GHRH-R forms according to their contribution to the physiopathological conditions.

Keywords: growth hormone-releasing hormone (GHRH), GHRH-receptor, expression system, isoforms, binding assay, cell imagery, structure-affinity study.

### III. TABLE DES MATIÈRES

I.	Résumé et mots clés français.....	i
II.	Résumé et mots clés anglais.....	iv
III.	Tables des matières.....	vi
IV.	Liste des figures.....	viii
V.	Liste des tableaux.....	x
VI.	Liste des abbréviations .....	xi
VII.	Dédicace .....	xvi
VIII.	Remerciements.....	xvii
1.	INTRODUCTION.....	1
1.1.	Hormone de croissance et facteur de libération de l'hormone de croissance.....	2
1.2.	Récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	5
1.2.1.	Structure du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	5
1.2.2.	Isoformes du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	7
1.2.3.	Structure du gène du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	14

1.2.4. Régulation de l'expression du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	17
1.2.5. Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	23
1.2.5.1. Récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	23
1.2.5.2. Récepteur extrahypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	29
1.2.6. Voies de signalisation du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	32
1.2.7. Localisation tissulaire du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	35
1.2.8. Rôles du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	37
1.3. Justification de l'étude.....	40
 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	44
3. RÉSULTATS.....	59
4. DISCUSSION.....	91
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	115
6. BIBLIOGRAPHIE.....	120

#### IV. LISTE DES FIGURES

Figure 1	Régulation de la sécrétion d'hormone de croissance dans la cellule somatotrope par le GHRH et la SRIF hypothalamique ainsi que les rétrocontrôles négatifs par le GHRH, la GH et l'IGF-I.....	4
Figure 2	Structure du récepteur de rat du facteur de libération de l'hormone de croissance.....	7
Figure 3	Analyse de restriction des constructions pcDNA3.1-RPR18c (18c), pcDNA3.1-RPR2c (2c), pcDNA3.1-GHRH-R $\alpha$ ( $\alpha$ ) et pcDNA3.1-GHRH-R $\beta$ ( $\beta$ ).....	61
Figure 4	Représentation schématique des résultats de séquençage des trois constructions pcDNA3.1-RPR18c, pcDNA3.1-RPR2c et pcDNA3.1-GHRH-R $\beta$ .....	63
Figure 5	Représentation autoradiographique d'une analyse par essai de protection à la RNase des niveaux de transcrit d'ARNm du GHRH-R dans les cellules BHK 570, HeLa et HEK 293 sauvages (-) et transfectées de façon stable (+) avec pcDNA3.1-RPR18c. ....	68
Figure 6	Visualisation par immunofluorescence du GHRH-R dans les cellules BHK 570 transfectées de façon stable avec pcDNA3.1_RPR18c (A), sauvages (B) et transfectées avec hGHRH-R (C).....	69
Figure 7	Analyse de restriction des constructions Zem219b-RPR18c, Zem219b-RPR2c et Zem219b-GHRH-R $\beta$ . ....	74

Figure 8	Représentation autoradiographique d'un buvardage Northern montrant les niveaux de transcrits de 2,5 kb d'ARNm du GHRH-R dans les cellules BHK 570 sauvages (S) et transfectées de façon stable avec Zem219b-RPR18c (18c) ou Zem219b-hGHRH-R (H-témoin positif), ainsi que dans des homogénats de cellules de foie (F-témoin négatif).....	75
Figure 9	Représentation type de la fluorescence de surface du Fluo-GHRH dans les cellules BHK 570 transfectées ou non avec Zem219b-RPR18c.....	79
Figure 10	Représentation type de la cinétique d'internalisation du Fluo-GHRH dans les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c..	80
Figure 11	Cinétique d'internalisation du Fluo-GHRH dans les cellules BHK570 transfectées avec Zem219b-RPR18c .....	81
Figure 12	Représentation type de la distribution du Fluo-GHRH dans les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c, en présence d'inhibiteurs de l'internalisation.....	83

## V. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Résultats de mise au point des conditions d'expression du GHRH-R.....	66
Tableau 2	Mise au point des conditions d'expression du rGHRH-R.....	71
Tableau 3	Comparaison des paramètres de liaison du GHRH dans les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c, co-transfectées avec Zem219b-RPR18c et le vecteur pAdVantage® ou transfectées avec Zem219b-hGHRH-R.....	76
Tableau 4	Affinité de liaison des analogues Ala et D-monosubstitués du hGHRH(1-29)NH <sub>2</sub> dans les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c.....	85
Tableau 5	Résultats d'essai de liaison dans des préparations membranaires ou homogénats de cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR2c et Zem219b-GHRH-Rβ du rGHRH-R en comparaison avec Zem219b-hGHRH-R et Zem219b-RPR18c.....	90
Tableau 6	Comparaison des résidus du hGHRH(1-29)NH <sub>2</sub> impliqués dans la liaison (pharmacophores de liaison) et/ou dans le maintien d'une conformation optimale du hGHRH(1-29)NH <sub>2</sub> dans le but d'une liaison à haute affinité (structure du ligand) aux hGHRH-R, au rGHRH-R de l'hypophyse antérieure et au rGHRH-R de 423 aa transfecté dans les cellules BHK 570.....	105

## VI. LISTE DES ABRÉVIATIONS

9cRA	:acide rétinoïque 9 cis
aa	:acide aminé
ADNc	:acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc	:adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique
ANB-NOS	: <i>UV-activatable heterobifunctional cross-linking reagent</i>
AP-1 et 4	:facteurs potentiateurs 1 et 4
ARNm	:acide ribonucléique messenger
ARNr 28S	:acide ribonucléique ribosomal 28S
BGH	:queue de polyadénylation
BHK	:lignée de cellules rénales de bébé hamster
BLAST	: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
B <sub>max</sub>	:capacité maximale de liaison
BRET	: <i>Bioluminescence resonance energy transfer</i>
Brn-2	:facteur de transcription <i>brain-2</i>
BSA	:albumine sérique bovine
B/T	: <i>Bound/Total</i> ; concentration apparente de récepteur
CCK	:cholecystokinine
C/EBP $\alpha$	: <i>CCAAT/Enhancer-binding protein alpha</i>
CMV	:cytomégalovirus
COS-7	:cellules rénales de singe vert d'Afrique
CREB	:facteur de transcription se liant à l'élément de réponse de l'AMPc
CRF	:facteur de libération de la corticotropine

DAG	:1,2-diacylglycérol
DAI	: <i>double RNA-activated inhibitor</i>
DMEM	: <i>Dulbecco modified Eagle's medium</i>
DMSO	:diméthyl sulfoxide
EC <sub>50</sub>	:concentration effective d'une substance produisant 50% de la réponse maximale
E. Coli.	: <i>Escherichia Coli</i>
eiF-2	: <i>eucaryotic initiation factor-2</i>
Ets-1	: <i>transcription factor E26 transformation-specific-1</i>
FBS	:sérum bovine foetal
Fluo-GHRH	: $[N^{\alpha}$ -5carboxyfluoresceinyl-D-Ala <sup>2</sup> , Ala <sup>8</sup> , Ala <sup>15</sup> , Lys <sup>22</sup> ]hGHRH(1-29)NH <sub>2</sub>
G418	:généticine
GAPDH	: Glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase
Gβγ	:sous-unité β et γ de la protéine G
GCN2	: <i>general control non-derepressible-2</i>
GH	:hormone de croissance
GHF-1	: <i>growth hormone factor-1</i>
GHRH	:facteur de libération de l'hormone de croissance
GHRH-R	:récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance
GHRH-Rβ	:isoforme de 480 aa du rGHRH-R
GIP	:peptide inhibiteur gastrique
GLP-1	:peptide « glucagon-like » de type 1
GHRP-2	:peptide de libération de l'hormone de croissance 2



GHRP-6	:peptide de libération de l'hormone de croissance 6
G <sub>s</sub>	:protéine G stimulatrice
HEK 293	:cellules rénales humaines
HeLa	:cellules épithéliales humaines d'adénocarcinome du col de l'utérus
hGHRH	:facteur de libération de l'hormone de croissance humain
HRI	: <i>heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase</i>
h	:heure
hGHRH-R	:récepteur humain du facteur de libération de l'hormone de croissance
IC <sub>50</sub>	:concentration d'une substance inhibant 50% de la liaison spécifique d'un radiogand
<sup>125</sup> I-GHRH	: [ <sup>125</sup> I-Tyr <sup>10</sup> ]hGHRH(1-44)NH <sub>2</sub>
IP <sub>3</sub>	:inositol 1,4,5, tri-phosphate
K <sub>d</sub>	:constante de dissociation à l'équilibre apparente
kb	:kilo paire de base
kDa	:kilodalton
LB	:Luria Bertani
LNCap	:cellules cancéreuses prostatiques humaines
MAPK	: <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK1	: <i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
min	:minute
MRE	: plusieurs éléments de réponse à des métaux
MTF-1	: <i>metallothionein factor-1</i>
MtT/S	:cellules de carcinome hypophysaire de rat

NF-1	:facteur nucléaire 1
NF- $\kappa$ B	:facteur nucléaire- $\kappa$ B
OPTI-MEM	: <i>OPTI-modified Eagle's medium</i>
PACAP	:peptide hypophysaire stimulateur de l'adénylate cyclase
pAdV®	:vecteur pAdVantage®
pb	:paire de base
PC	:poids corporel
PERK	: <i>dsRNA-dependent protein kinase(PKR)-like endoplasmic reticulum-resident kinase</i>
PHI	:peptide histidine isoleucine
PIP <sub>2</sub>	:phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
Pit-1	:facteur de transcription spécifique à l'hypophyse
PKA	:protéine kinase A
PKC	:protéine kinase C
PKR	: <i>double-stranded RNA-dependent protein kinase</i>
rGHRH	:facteur de libération de l'hormone de croissance de rat
rGHRH-R	:récepteur de rat du facteur de libération de l'hormone de croissance
RE	:réticulum endoplasmique
RPA	:protection à la RNase
RPR18c	:forme native de 423 aa du rGHRH-R
RPR2c	:isoforme de 464 aa du rGHRH-R
RT-PCR	:transcription inverse suivie d'une amplification en chaîne par une polymérase ( <i>reverse transcribed polymerase chain reaction</i> )
SV1 à 4	:isoformes du GHRH-R

T <sub>3</sub>	:thyroidothyronine
T <sub>4</sub>	:thyroxine
TRE	:élément de réponse des récepteurs des hormones thyroïdiennes
USF	: « upstream stimulatory factor »
UV	:rayon ultra violet
v/v	:volume/volume
VAI	: <i>adenovirus associated 1 RNA</i>
VIP	:peptide intestinal vasoactif

AUX AMOURS DE MA VIE,  
DEPUIS ET POUR TOUJOURS,  
MAMAN, PAPA, GENEVIÈVE ET  
MATHIEU.

## VII. REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout spécialement le D<sup>re</sup> Pierrette Gaudreau pour son soutien, ses nombreux encouragements et l'expertise acquise au laboratoire de Neuroendocrinologie du Vieillissement. Je voudrais également lui transmettre ma pleine et sincère reconnaissance pour m'avoir donné la chance de poursuivre mes études au deuxième cycle. Mon expérience passée dans ce laboratoire m'ont valu trois années ardues de travail... équivalent à trois riches années de souvenirs.

Mes remerciements aux membres de mon jury d'évaluation de mémoire, les D<sup>rs</sup> Marc Prentki et Serge Saint-Pierre pour leurs importants commentaires et suggestions permettant sa bonification.

Je voudrais, de plus, exprimer ma gratitude à tous les membres du laboratoire pour leur support, leurs encouragements et les bons moments passés ensemble : Alma Robert, Christelle Veyrat-Durebex, Chantale Boisvert, Caroline Paré, Julie Strecko, Sophie Dubuisson, Katherine Farrajota, Daniel Langlois et la toute dernière, Julie Bédard.

J'aimerais remercier à nouveau les membres de ma famille pour leur support, dans tous les sens du terme, leur confiance et leur présence depuis le début. J'en profite pour vous dire que je vous aime.

J'aimerais également remercier mes précieux ami(e)s pour leur support moral et technique (pour certains) ainsi que pour leur présence continue : Sylvie Dussault, Diem Vu, Philippe Lampron, Danny Sylvain, David Ostigny, Mélanie Asselin, Johane Racicot (ma petite perle), Carlos Mejia, Chantale Côté, Dominic Millette, François Gaudreau, Geneviève Moreau, Isabelle Petit et Jean-Luc Bedwani.

Finalement, je désire remercier les Instituts de Recherche en Santé du Canada qui ont supporté ce projet ainsi que la Faculté des Études supérieures de l'Université de Montréal pour la bourse qu'elle m'a attribuée.

# **1. INTRODUCTION**

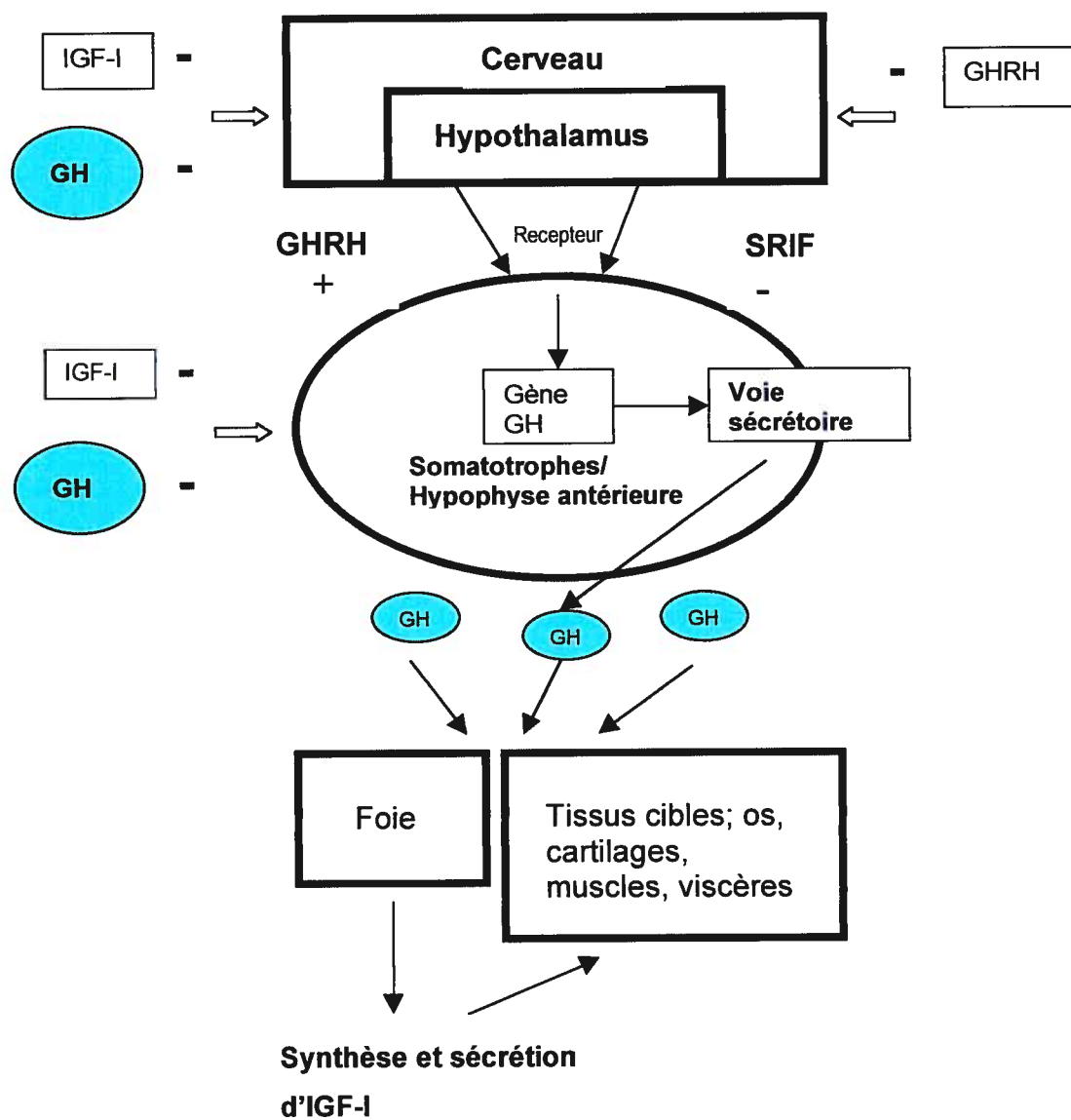
### **1.1. Hormone de croissance et facteur de libération de l'hormone de croissance.**

L'hormone de croissance (GH) est une protéine de 191 aa, sécrétée de façon épisodique par les cellules somatotrophes de l'hypophyse antérieure. Par son récepteur situé sur plusieurs tissus et organes cibles tels les os, les cartilages, les muscles et les viscères, la GH stimule, de façon directe ou indirecte par l'entremise du facteur insulinaire de croissance de type I (IGF-1) hépatique, la prolifération et la différenciation cellulaire, en plus d'être responsable de la croissance staturale (Nilson et coll., 1994; Andreassen et coll., 1996). La majorité de la concentration circulante d'IGF-1 provient du foie (D'Ercole et coll., 1984; D'Ercole et coll., 1986) et la GH, stimulant sa synthèse et sa sécrétion (Schwander et coll., 1983) représente son plus puissant sécrétagogue. La stimulation de la synthèse d'IGF-1, par la GH circulante, a également été rapportée au niveau des adipocytes, des chondrocytes et des cellules du tube collecteur où ce facteur de croissance exerce une action autocrine (Isgaard et coll., 1988; Peter et coll., 1993). La GH stimule également la synthèse protéique, donc l'augmentation de masse musculaire ainsi que la lipolyse et la diminution de masse adipeuse (Andreassen et coll., 1999; Cohick et coll., 1993). Le contrôle de la sécrétion de la GH est assurée principalement par deux hormones hypothalamiques : le facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH) et la somatostatine (SRIF), synthétisées respectivement par les neurones du noyau arqué et périventriculaire de l'hypothalamus (Rivier et coll., 1982; Brazeau et coll., 1973). Par l'intermédiaire de leur récepteur respectif



(Mayo, 1992; Yamada et coll., 1992), le GHRH stimule la synthèse et la sécrétion de la GH alors que la SRIF les inhibent (Tannenbaum et coll., 1984; Barinaga et coll., 1983; Saret et coll., 1999). Des mécanismes de rétrocontrôles négatifs de plusieurs peptides et hormones, incluant le GHRH, la somatostatine, la GH et IIGF-1 (Kamegai et coll., 1998) assurent une régulation optimale de la sécrétion de la GH (Figure 1).

**Fig. 1 :** Régulation de la sécrétion de l'hormone de croissance dans la cellule somatotrope par le GHRH et la SRIF hypothalamique ainsi que les rétrocontrôles négatifs par le GHRH, la GH et l'IGF-I.



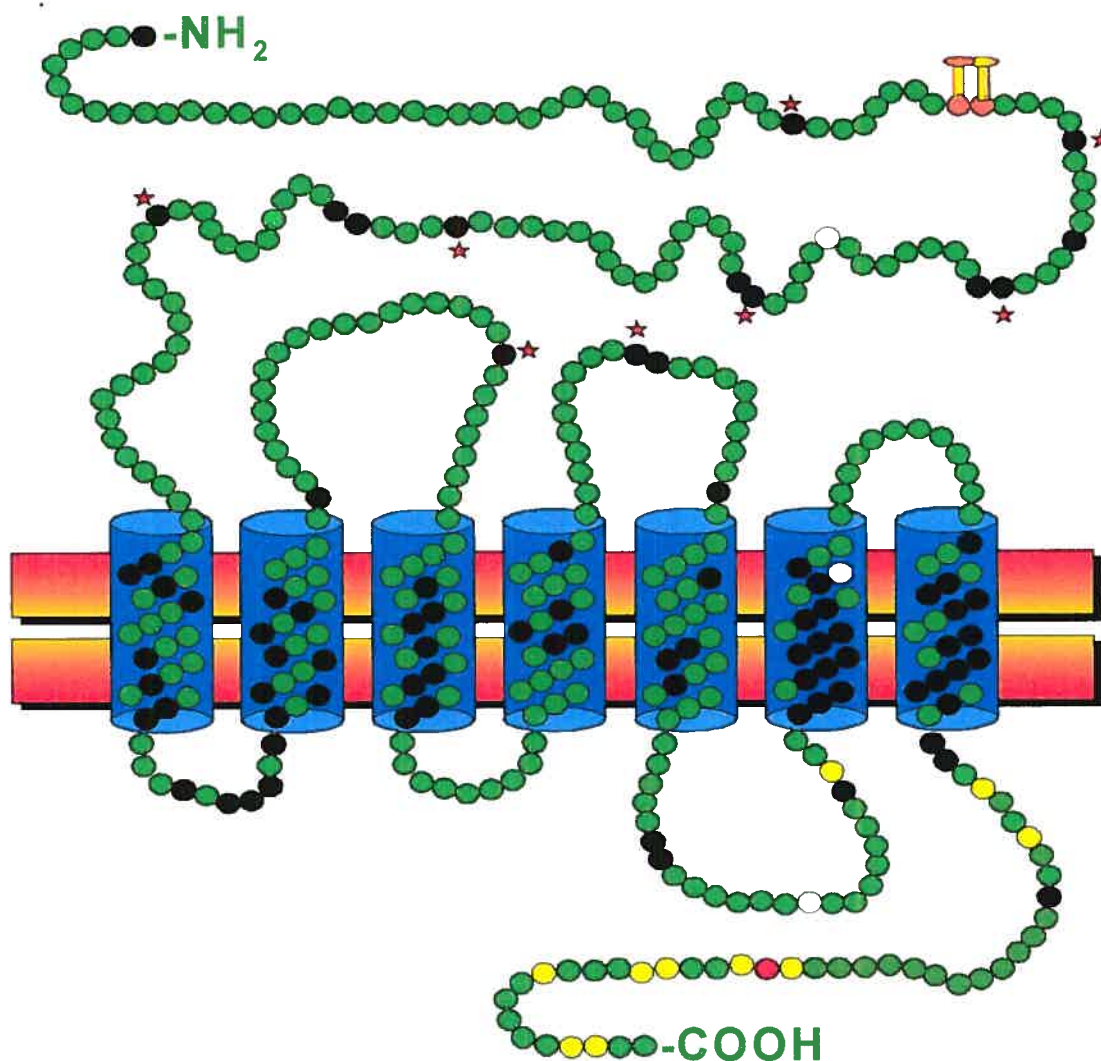
## 1.2. Récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance

### 1.2.1 Structure du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance

Le récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance (GHRH-R) est un récepteur membranaire appartenant à la sous-famille B-III des récepteurs couplés aux protéines G (Kolakowski et coll., 1997). Il a été cloné dans l'hypophyse antérieure chez l'humain (Mayo, 1992; Gaylinn et coll., 1993), le rat (Mayo, 1992), la souris (Lin et coll., 1992), le porc (Hsuing et coll., 1993), le bœuf et le mouton (Horikawa et coll., 2001). Cette sous-famille comprend également les récepteurs du peptide intestinal vasoactif (VIP) (Ishihara et coll., 1992), de la sécrétine (Ishihara et coll., 1991), du glucagon (Jelinek et coll., 1993), du peptide *glucagon-like* de type 1 (GLP-1) (Thorens et coll., 1992), du peptide inhibiteur gastrique (GIP) (Usdin et coll., 1993), du peptide hypophysaire stimulateur de l'adénylate cyclase (PACAP) (Pisegna et coll., 1993) et du facteur de libération de la corticotropine (CRF) (Chen et coll., 1993). Parmi ceux-ci, c'est avec les récepteurs du VIP (40%) et de la sécrétine (35%) que le GHRH-R partage l'identité de séquence la plus élevée (Mayo et coll., 1996). Les récepteurs de rat et de souris du GHRH comportent 94% d'homologie entre eux, alors qu'ils comportent 82% d'homologie avec le récepteur humain (Mayo et coll., 1995). Quant au GHRH-R porcin, il comporte 86, 82 et 80% d'homologie avec les récepteurs humain, de rat et de souris, respectivement (Hsiung et coll., 1993).

Le GHRH-R possède plusieurs caractéristiques conservées parmi les récepteurs couplés aux protéines G, en plus de ses sept domaines transmembranaires et de son domaine N-terminal extracellulaire et C-terminal intracellulaire. Il possède au moins un site amino-terminal de N-glycosylation et des sites potentiels de phosphorylation dans la troisième boucle cytoplasmique et la partie C-terminale. Il renferme plusieurs résidus hautement conservés dans les domaines transmembranaires (Mayo et coll., 1996), des résidus cystéines dans les deuxième et troisième boucles extracellulaires qui formeraient des ponts disulfures et une cystéine dans la partie C-terminale intracytoplasmique pouvant être palmitoylée (Mayo et coll., 1996). Le long domaine N-terminal du GHRH-R comporte plusieurs résidus conservés dont six cystéines, un acide aspartique, un tryptophane et une glycine aux positions correspondant aux acides aminés 60, 65 et 100 (Segre et coll., 1993) (Fig. 1). Ce domaine extracellulaire s'avère important pour la liaison du GHRH. En effet, la mutation de l'acide aspartique en position 60 du GHRH-R par une glycine, chez la souris *little* résulte en une perte de capacité du récepteur à lier le GHRH et à activer l'adénylate cyclase (Godfrey et coll., 1993; Lin et coll., 1993). Une étude de récepteurs tronqués a permis de déterminer que ni le domaine extracellulaire N-terminal, ni le domaine C-terminal associé aux domaines transmembranaires incluant les boucles extracellulaires associées, ne peut lier le GHRH en absence de l'autre domaine (DeAlmeida et coll., 1998). L'analyse de chimères entre le GHRH-R et le récepteur du VIP ou de la sécrétine a révélé que même si la partie N-terminale représente un domaine critique pour la liaison du GHRH, elle peut

**Fig. 2 :** Structure du récepteur de rat du facteur de libération de l'hormone de croissance.



:Site potentiel de N-glycosylation



:Site potentiel de palmitoylation



:AA conservés dans la sous-famille B-III



:Sites potentiels de phosphorylation



:Cystéines conservées

être substituée par celle d'un récepteur apparenté de la sous-famille B-III et permettre la reconstitution d'un récepteur fonctionnel, suggérant que les domaines transmembranaires du GHRH-R et les boucles extracellulaires associées forment les déterminants clés de la spécificité de liaison du GHRH (DeAlmeida et coll., 1998).

Dans l'hypophyse de rat, le GHRH-R est présent sous forme de transcrits d'ARNm de 2 à 2.5 kb, donnant naissance à une protéine de 423 aa, et de 3.1 à 4 kb (Mayo, 1992; Lin et coll., 1993) dont la structure et le rôle ne sont pas encore connus.

### **1.2.2 Isoformes du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance**

Deux isoformes principales du GHRH-R ont été identifiées dans l'hypophyse antérieure de rat. Une première isoforme, clonée par Mayo résulte en une protéine de 464 aa. Ce récepteur possède une insertion de 123 pb équivalent à 41 aa au niveau de la troisième boucle intracytoplasmique, située immédiatement avant le sixième domaine transmembranaire (Mayo, 1992). Ce point d'insertion correspond à une jonction intron-exon, suggérant qu'un processus d'épissage alternatif de l'ARN génèrerait l'isoforme longue du récepteur. La forme courte, de 423 aa, est prédominante dans l'hypophyse. Cette isoforme longue lie le GHRH avec une affinité plus faible que la forme native de 423 aa du GHRH-R. De plus, la stimulation de cette isoforme par le

GHRH ne provoque aucune production d'AMPc contrairement à la forme courte (Miller et coll., 1999).

Une deuxième isoforme, identifiée par RT-PCR dans l'hypophyse de rat, a été décrite par l'équipe de Zeitler et coll. (1998). Ce dernier posséderait, comme la forme longue, une insertion de 123 pb (41 aa) au niveau de la troisième boucle intracytoplasmique ainsi qu'une délétion des 131 dernières pb (1278-1409), se traduisant par une substitution des cinq derniers aa de l'extrémité C-terminale et l'addition de 17 aa. Ce récepteur serait également généré par épissage alternatif de l'ARNm. Une stimulation de cette isoforme par le GHRH provoque l'accumulation d'AMPc intracellulaire (Zeitler et coll., 1998).

Trois isoformes, résultant de l'épissage alternatif de l'intron 11 ont été identifiés à partir de tumeurs hypophysaires GH-sécrétantes et non sécrétantes et d'hypophyses humaines normales (Tang et coll., 1995). Ces isoformes présentent une taille partielle de 1.3, 1.7 et 1.8 kb. La forme de 1.3 kb est la plus abondante et correspond au GHRH-R, alors que les deux autres variants contiennent des insertions d'environ 400 et 500 pb, respectivement en position 1025 du transcrit d'ARNm du GHRH-R. Ces formes proviendraient d'un processus d'épissage alternatif. Le variant de 1.7 kb donnerait donc une protéine tronquée à partir de l'aa 325, alors que celui de 1.8 kb donnerait une protéine tronquée à partir de l'acide aminé 338, mais dont les 12 derniers résidus sont différents de la séquence native du GHRH-R (Tang et coll., 1995).

Hashimoto et coll. (1995) ont identifié, par buvardage Northern, la présence de trois transcrits d'ARNm du GHRH-R de 2.0, 2.8 et 4.5 kb, dans les hypophyses humaines normales et tumorales. Le transcrit de 2 kb est le plus abondant et correspond à la séquence attendue de 423 aa alors que ceux de 2.8 et 4.5 kb correspondent aux variants de 1.7 et 1.8 kb décrits ci-haut. La séquence codante des transcrits de 2.8 et 4.5 kb contient un codon stop donnant naissance à des récepteurs tronqués au niveau de la troisième boucle intracytoplasmique. Dans les cellules Cos-7 transfectées avec le transcrit de 2.0 kb, le GHRH provoque une accumulation d'AMPc, mais non dans celles transfectées avec le transcrit de 4.5 kb (Hashimoto et coll., 1995). De plus, la co-transfection de ces deux transcrits mène à une production plus faible d'AMPc par le GHRH, suggérant que la forme longue du GHRH-R agit comme dominant négatif (Motomura et coll., 1998).

De plus, le clonage du GHRH-R à partir d'hypophyse de brebis a révélé que la structure du GHRH-R correspond chez cette espèce au segment 1-407 aa de la forme de 423 aa retrouvée chez les autres mammifères (Horikawa et coll., 2001). Une mutation en position 408 de la séquence codante modifie le tryptophane pour un codon stop (TGG→TGA) entraînant une délétion des 16 aa en C-terminal. La forme de 423 aa n'a pas été retrouvée chez la brebis et le mouton. Le séquençage de l'ADN génomique de la région contenant la mutation chez la brebis, dans l'hypophyse de chèvre a montré que les deux espèces présentent une mutation identique. La troncation du GHRH-R n'affecte pas les



paramètres de liaison du GHRH, mais augmente la sensibilité du GHRH à stimuler la production d'AMPc, suggérant que le domaine C-terminal contrôle l'efficacité de signalisation de la voie adénylate cyclase. Cette troncation élimine six sites potentiels de phosphorylation ce qui pourrait entraîner une inhibition de la régulation à la baisse du récepteur *via* son internalisation ou son inefficacité à se coupler à la protéine G (Horikawa et coll., 2001).

Dans l'hypophyse de porc, en plus du GHRH-R de 423 aa, une isoforme identique à la forme native pour les 418 premiers aa, mais différent des aa 419 à 423 et comportant une addition de 28 aa en C-terminal, a été identifiée. Cette protéine de 451 aa contient deux cystéines distinctes de la première isoforme dans le domaine C-terminal intracellulaire. La liaison spécifique du GHRH à cette isoforme est de plus faible affinité et entraîne une production d'AMPc également plus faible. Cette isoforme serait générée par épissage alternatif du même ARNm précurseur (Hsiung et coll., 1993; Hassan et coll., 1995; Hassan 2001).

Trois isoformes du GHRH-R ont été décrites chez les familles souffrant de nanisme. La première, identifiée chez des patients du Pakistan consiste en une mutation non-sens de l'exon 3 qui change l'acide glutamique (GAG) en position 50 en un codon stop (TAG). Il en résulte une protéine tronquée à partir du domaine N-terminal extracellulaire. Il est postulé que cette protéine serait non fonctionnelle et/ou exportée à la membrane cytoplasmique des cellules

somatotropes. Un faible retard de croissance est observé chez les porteurs de la forme hétérozygote (Baumann et coll., 1997; Maheshwari et coll., 1998). Une seconde mutation, identifiée chez des patients du Brésil, se situe dans le site donneur de l'épissage alternatif de l'intron 1 modifiant la guanine en une adénine en position 1. Ceci résulte en la rétention de la région intronique 1 dans l'ARNm mature. Une protéine tronquée au 213<sup>ième</sup> nucléotide de l'exon 1 est ainsi produite, dû au changement du cadre de lecture (Hayashida et coll., 2000). La troisième mutation, identifiée chez des patients du Sri Lanka, consiste en la modification de la guanine en position 72 en une thymine (codon stop). Ceci se traduirait également en une protéine tronquée sans domaines transmembranaires (Salvatori et coll., 1999). Pour les trois mutations décrites, un phénotype de nanisme est observé chez les porteurs de la forme homozygote (Baumann et coll., 1997; Maheshwari et coll., 1998; Hayashida et coll., 2000; Salvatori et coll., 1999).

Une isoforme provenant de tumeurs hypophysaires humaines a également été décrite comme étant un polymorphisme naturel puisque la mutation est aussi retrouvée dans l'ADN génomique provenant du sang des patients étudiés. Elle comporte une mutation ponctuelle dans le codon 57, GCG → ACG, produisant une substitution de l'alanine par une thréonine. Une augmentation de 40 à 200 fois de la production d'AMPc et de 6.5 fois de la production de GH a été observée dans des cellules hypophysaires cancéreuses en culture, exprimant la protéine mutée, suite à une stimulation au GHRH. Le

mécanisme conférant cette hypersensibilité est encore inconnu. Toutefois, il est postulé que cet aa, situé dans le domaine N-terminal extracellulaire, soit important pour la liaison du GHRH (Adams et coll., 2000).

Rekasi et coll. (2000) ont décrit des isoformes du GHRH-R présentes dans des tissus extrahypophysaires, isolés de cellules LNCap humaines de cancer de la prostate. Ces isoformes ont été détectées par PCR, en utilisant des amorces situés dans l'intron 3 et l'exon 8. Il en existe quatre : SV1, SV2, SV3 et SV4. SV1 possède 99% d'identité avec le GHRH-R hypophysaire pour la région nucléotidique 77 à 1383, correspondant aux exons 4 à 13. Les 334 premiers nucléotides, équivalent à l'intron 3, sont complètement différents du GHRH-R natif. Cette isoforme est générée par épissage alternatif qui utilise le site donneur de l'exon 3 comme site accepteur de l'exon 4, conservant l'intron 3 mais éliminant les 3 premiers exons. La séquence nucléotidique est de 720 pb alors que la protéine est de 359 aa. La séquence intronique de 25 aa équivaut à un domaine extracellulaire. Les auteurs rapportent une délétion des sites potentiels de glycosylation ainsi que des 6 premières cystéines du domaine N-terminal extracellulaire. Cette isoforme est retrouvée dans les cellules cancéreuses de prostate, de poumon, du sein, d'ovaire et dans les cellules normales de foie, du pancréas et de la prostate (Rekasi et coll., 2000). SV2 possède une séquence de 566 pb, encodant une protéine de 145 aa. Ce récepteur, tronqué à partir de la première boucle extracellulaire, résulte de la présence d'un codon stop prématuré dans l'exon 8. Cette isoforme est également retrouvée dans tous les

types cellulaires mentionnés ci-haut, sauf dans le tissu pancréatique normal. SV3, une protéine de 151 aa, est encodée par une séquence nucléotidique de 390 pb. L'intron 3 est absent de cet isoforme, ce qui déplace le site d'initiation de la transcription dans l'exon 6. Le cadre de lecture est complètement différent de celui de SV1 et l'exon 7 est absent de l'ARNm. Cette isoforme a uniquement été retrouvée dans les cellules humaines prostatiques normales. Enfin, SV4 est une protéine de 68 aa encodée par un ARNm de 335 pb. Les exons 5, 6 et 7 sont absents de l'ARNm. Cette isoforme a exclusivement été retrouvée dans les cellules d'adénomes hypophysaires humains (Rekasi et coll., 2000).

Enfin, une isoforme identifiée chez la souris *little* consiste en une mutation A → T au niveau du second nucléotide du codon 60 remplaçant l'acide aspartique par une glycine. Cet acide aspartique est normalement conservé dans le GHRH-R de rat, de souris et d'humain ainsi que dans les autres récepteurs couplés aux protéines G de la sous-famille B-III. Cette mutation provoque une incapacité du GHRH à stimuler le GHRH-R et la production d'AMPc (Godfrey et coll., 1993; Lin et coll., 1993). Chez la souris *little*, une diminution de dix fois le nombre de cellules somatotropes et de la production de GH a été rapportée (Lin et coll., 1993).

### **1.2.3. Structure du gène du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance**

Le gène du GHRH-R humain a été localisé sur le bras court du

chromosome 7 (7p14 (Gaylinn, von Kap-Herr et coll., 1994) ou 7p15 (Wajnrajch et coll., 1994)). Ce gène s'étend sur 15 kb et renferme 13 exons. La taille moyenne des exons est de 100 pb (Petersenn et coll., 1998) alors que celle des introns est de 126 à 4708 pb (Petersenn et coll., 2000). Un seul site d'initiation de la transcription a été identifié dans le gène du GHRH-R humain. Il est situé à 40 pb en amont du site d'initiation de la traduction (Petersenn et coll., 1998). Une région de 2.7 kb, en amont du site d'initiation de la transcription, a été analysée par Petersenn et coll. (1998) ainsi que par Iguchi et coll. (1999) afin d'étudier la structure et la régulation du gène du GHRH-R. Cette séquence comprend trois sites importants pour la liaison du facteur de transcription Pit-1 ou *growth hormone factor 1* (GHF-1) spécifique à l'hypophyse en position -1009, -799 et -127, de même qu'un site de liaison pour *brain-2* (Brn-2) en position -700 (Petersenn et coll., 1998). Un quatrième site de liaison de Pit-1, situé entre les positions -171 à -160 a été rapporté (Iguchi et coll., 1999). Des sites de liaison des facteurs potentiators AP-1 et AP-4, des séquences consensus pour le facteur nucléaire NF-1 ainsi que le *upstream stimulatory factor* (USF) ont également été identifiés dans la région promotrice du GHRH-R humain (Petersenn et coll., 1998). D'autres régions consensus correspondant à des éléments inductibles du promoteur sont également présentes, tel que des sites de liaison au facteur de transcription CREB en position -483, au facteur NF- $\kappa$ B en position -429 ainsi qu'aux glucocorticoïdes entre les positions -1456 et -1181 (Petersenn et coll., 1998). La région entre -202 et -108 pb contient un élément de réponse négatif à l'œstrogène (Petersenn et coll., 1998). Aucun élément

potentiel requis pour l'initiation de la transcription, soit une boîte TATA, CCAAT ou une séquence initiatrice n'a été identifié (Petersenn et coll., 1998). Le promoteur du gène du GHRH-R appartiendrait donc à la même famille que le promoteur du gène de l'enzyme déoxynucléotidyl transférase terminale, qui sont pour la plupart régulés au cours du développement ou de la différenciation cellulaire (Petersenn et coll., 1998).

Le gène du GHRH-R de rat est composé de 14 exons s'étendant sur 15 kb (Miller et coll., 1999). La taille moyenne des exons est de 100 pb alors que celle des introns varie de 111 pb à plus de 2 kb. Trois sites importants d'initiation de la transcription ont été identifiés aux positions 286, 93 et 84 pb en amont du site initiateur de la traduction alors qu'un site mineur a été observé en position 203 (Miller et coll., 1999). Nogami et coll. (2002) ont identifié un cinquième site potentiel initiateur de la transcription à la position -105 du site d'initiation de la traduction. La séquence codant pour le domaine extracellulaire N-terminal est contenue dans les exons 1-4 alors que les exons 5-14 codent pour les domaines transmembranaires, les boucles intra et extracellulaires et le domaine C-terminal. Plusieurs sites potentiels de liaison à Pit-1 ont été identifiés dans la région promotrice de 1.9 kb en amont du site initiateur de la traduction (Miller et coll., 1999; Nogami et coll., 2002). Ceux-ci pourraient agir de façon synergique avec des sites GATA (en positions -1538, -1145, -712, -632, -221, -16, +126 et +215), *transcription factor E26 transformation-specific-1* (Ets-1) (en position -1058) et *CCAAT/Enhancer-binding protein alpha* (C/EBP $\alpha$ ) (en positions -1508 et -880).

(Miller et coll., 1999). De plus, il a été rapporté que les glucocorticoïdes (Lam et coll., 1996; Miller et coll., 1997; Korytko et coll., 1997) et les hormones thyroïdiennes (Korytko et coll., 1997; Miki et coll., 1995) régulent de façon positive les niveaux d'ARNm du GHRH-R hypophysaire chez le rat *in vivo* et *in vitro*. Nogami et coll. (2002) ont d'ailleurs identifié deux éléments de réponse fonctionnels aux glucocorticoïdes entre les positions -166 et -181, et les positions -195 et -209 ainsi qu'un élément de réponse aux hormones thyroïdiennes entre les positions -204 et -221. Un élément de réponse fonctionnel à l'acide rétinoïque a été également identifié dans la région -1090 à -1074 (Nogami et coll., 2002). De plus, tel que pour le GHRH-R humain, l'œstrogène inhibe l'expression du GHRH-R de rat (Miller et coll., 1997). Enfin, la régulation à la baisse de l'expression du GHRH-R par le GHRH (Aleppo et coll., 1997) serait médiée dans l'hypophyse de rat par le facteur de transcription CREB, dont les éléments de réponse sont situés dans la région promotrice du gène du récepteur.

Chez la souris, le gène du GHRH-R a été localisé sur le chromosome 6 et comprend 13 exons s'étendant sur plus de 10 kb (Lin et coll., 1993).

#### **1.2.4. Régulation de l'expression du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance**

La régulation du GHRH-R est modulé par plusieurs hormones. D'abord, les glucocorticoïdes augmentent l'expression des niveaux d'ARNm du GHRH-R

dans l'hypophyse de rat, ainsi que le nombre de sites de liaison au GHRH (Lam et coll., 1996; Miller et coll., 1997; Seifert et coll., 1985). Seifert et coll. (1985) ont montré qu'une surrénalectomie chez le rat entraîne une diminution drastique du nombre de sites de liaison du GHRH-R dans l'hypophyse, qui est renversée suite à un traitement au dexaméthasone. De plus, Lam et coll. (1996) ont rapporté une diminution du niveau d'ARNm du GHRH-R dans l'hypophyse de rat suite à une surrénalectomie, lequel est normalisé suite à un traitement au dexaméthasone (Lam et coll., 1996; Miller et coll., 1997). Une augmentation du niveau d'ARNm du GHRH-R est également observée dans des cellules d'hypophyse de rat, en culture, après traitement au dexaméthasone en absence mais non en présence d'actinomycine D (Miller et coll., 1997). L'ensemble de ces résultats indiquent que les glucocorticoïdes peuvent augmenter directement la transcription du gène du GHRH-R.

Les hormones thyroïdiennes influencent également l'expression du gène du GHRH-R. Miki et coll. (1995) ont rapporté une réduction importante du niveau d'ARNm du GHRH-R dans l'hypophyse de rats thyroïdectomisés, avec un renversement du phénomène suite à une thérapie de remplacement à la thyroxine ( $T_4$ ). Ce traitement affecte parallèlement le contenu hypophysaire en GH, diminuant sa synthèse et sa sécrétion lors de la thyroïdectomie, sans toutefois affecter la synthèse et la libération de GHRH hypothalamique (Miki et coll., 1995). Après trois semaines d'hypothyroïdie suite à l'injection de bloqueurs de la synthèse de  $T_4$ , les niveaux de transcrits de 2.5 et 4 kb d'ARNm du GHRH-



R diminuent de 1.7 fois chez le rat (Tam et coll., 1996), la concentration des sites de liaison à haute et basse affinité du GHRH-R diminuent de 4.6 et 15.2 fois, respectivement alors que la concentration des complexes immunoréactifs du GHRH-R de 65 et 47 kDa diminuent également de 1.3 et 3.5 fois, respectivement (Boulanger et coll., 1999). Des études *in vitro* ont également confirmé le rôle des hormones thyroïdiennes dans l'expression du gène du GHRH-R. Une augmentation du niveau d'expression de l'ARNm du GHRH-R par la  $T_3$  a été observée dans des cellules MtT/S ainsi que les cellules en culture d'hypophyse fœtale de rat (Nogami et coll., 2000). Cette augmentation est synergique lorsque les cellules MtT/S sont incubées simultanément avec de la  $T_3$  et du dexaméthasone (Nogami et coll., 2000). Les hormones thyroïdiennes régulent ainsi l'expression du GHRH-R en agissant directement sur la transcription du gène du GHRH-R et non en modulant la synthèse et la sécrétion du GHRH.

De plus, l'expression du gène du GHRH-R est modulée par l'acide rétinoïque. Une augmentation de l'expression de l'ARNm du GHRH-R dans des cellules MtT/S en culture ainsi que dans des cellules d'hypophyse fœtale de rat a été mise en évidence suite à un traitement de 24 heures avec l'acide rétinoïque et/ou la *9-cis-retinoic acid* (9cRA) en synergie avec le dexaméthasone (Nogami et coll., 2000). Cette augmentation de l'expression de l'ARNm du GHRH-R n'est pas additive, c'est-à-dire qu'elle n'augmente pas proportionnellement aux concentrations croissantes d'acide rétinoïque (Nogami et coll., 2000). Nogami et

coll. (2000) ont également observé un effet synergique au niveau de l'expression de l'ARNm du GHRH-R lorsque l'acide rétinoïque ou la 9cRA est combinée à la T<sub>4</sub> et le dexaméthasone.

Ono et coll. (1995) ont démontré qu'il existe un dimorphisme sexuel important de l'expression du gène du GHRH-R hypophysaire chez la rate ou les niveaux d'ARNm du GHRH-R représentent 15% de ceux retrouvés chez le mâle du même âge. Les femelles montrent également une capacité de sécrétion du GHRH de 33% plus faible que celle des mâles. Cette diminution du niveau d'expression du GHRH-R et de la capacité à libérer le GHRH affecte la croissance, car les femelles croissent moins rapidement et atteignent un poids corporel inférieur à celui des mâles à l'âge adulte (Ono et coll., 1995). Il a été démontré que les œstrogènes inhibent l'expression du gène du GHRH-R (Lam et coll., 1996), ce qui pourrait expliquer la différence de niveaux d'ARNm entre les deux sexes. En effet, il a été rapporté qu'une ovariectomie, chez des rates de 4 semaines, induit une augmentation du niveau d'ARNm du GHRH-R qui est diminué suite à un traitement avec le 17  $\beta$ -estradiol (Lam et coll., 1996). Finalement, une augmentation des niveaux d'ARNm du GHRH-R est observée au cours de la maturation sexuelle chez le rat mâle (Korytko et coll., 1996), suggérant un rôle de la testostérone dans la régulation de l'expression des niveaux de GHRH-R, soit au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel.

En plus des hormones nucléaires, le GHRH module l'expression de son

propre récepteur en plus de favoriser la synthèse et la sécrétion de GH (Horikawa et coll., 1996; Iguchi et coll., 1999). Des études *in vitro* avec des cellules hypophysaires de rats nouveaux nés et adultes ont démontré une modulation de l'expression de l'ARNm du récepteur lorsque les rats sont traités avec le GHRH (Lasko et coll., 2001). Une réduction significative des niveaux d'ARNm du GHRH-R est observée après 4 heures de traitement, une restauration du niveau basal après 24 heures et une augmentation après 72 heures. Cette stimulation est plus prononcée chez les rats nouveaux nés que chez les rats adultes (Lasko et coll., 2001). Une immunisation passive de 14 jours contre le GHRH chez des rats de 1, 25 et 70 jours provoque une diminution significative du niveau d'ARNm du GHRH-R hypophysaire (Lasko et coll., 2001). Le GHRH agit également au niveau des sites à haute affinité du GHRH, où une augmentation de 2 fois le nombre de sites à haute affinité est observée dans l'hypophyse de rats de 2 mois, soumis à un traitement au GHRH de 14 jours (0.5mg/kg de poids corporel (PC) de hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>, 1 fois/ jour) (Girard et coll., 1999). Ils sont diminués de 2.4 fois lorsque la dose de GHRH est augmentée à 1.0 mg/kg PC (Girard et coll., 1999). Ainsi, le GHRH régule de façon négative ou positive la transcription du gène de son récepteur selon le dosage utilisé.

La GHRH-R est également régulé au cours de différentes situations physiopathologiques tel le développement et le vieillissement. D'abord, une régulation du GHRH-R a été observée au cours du développement chez le rat.

L'ARNm du récepteur est détectée dans l'hypophyse dès l'âge embryonnaire de 19.5 jours, puis diminue pour atteindre son niveau le plus bas à l'âge postnatal de 12 jours (Korytko et coll., 1996). Ce niveau augmente à nouveau jusqu'à l'âge de 30 jours pour diminuer graduellement, subséquemment (Korytko et coll., 1996). L'augmentation de l'expression du gène du GHRH-R à 30 jours coïncide avec le début de la maturation sexuelle (Korytko et coll., 1996).

Des études de buvardage Western et Northern ont permis de quantifier et caractériser le GHRH-R dans l'hypophyse de rats mâles Sprague Dawley de 2, 8, 14 et 18 mois, soit au cours du vieillissement (Gaudreau et coll., 1999). Des entités immunoréactives de 44, 47 et 65 kDa ont été détectées dans l'hypophyse de tous les rats. Toutefois, une diminution significative des entités de 65 et 47 kDa a été observée chez les rats de 8, 14 et 18 mois, alors que la forme de 44 kDa ne diminue pas significativement (Gaudreau et coll., 1999). De plus, une augmentation de 1.8 à 2.3 fois du transcrit d'ARNm de 4 kb du GHRH-R est observée chez les rats de 8, 14 et 18 mois, parallèlement à une diminution de 30 % de la concentration du transcrit de 2.5 kb dans environ 50% des hypophyses de rats de 8, 14 et 18 mois (Gaudreau et coll., 1999). Conséquemment, une augmentation du ratio des transcrits de 4/2.5 kb de 1.5 à 1.7 fois est observée chez les rats de 14 et 18 mois par rapport aux rats de 2 mois (Gaudreau et coll., 1999). Ainsi, les altérations des paramètres de liaison des sites à haute et basse affinité du GHRH-R, identifiées dans l'hypophyse de rat au cours du vieillissement, pourraient refléter des changements de concentration de transcrits

d'isoformes du GHRH-R. Des modifications des processus de régulation de leur expression, ayant pour résultat une diminution de l'abondance de GHRH-R fonctionnel pourraient donc être en partie responsables d'un fonctionnement non optimal des cellules somatotropes chez le rat âgé (Gaudreau et coll., 1999).

### **1.2.5. Caractéristiques pharmacologiques et biochimiques du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance**

#### **1.2.5.1. Récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance**

Les études de radioliation ont constitué les premières techniques permettant de caractériser le GHRH-R dans l'hypophyse de différents mammifères. Des études de saturation dans des homogénats d'hypophyse antérieure de rat de 2 mois à l'aide du ligand [ $^{125}\text{I}$ -Tyr $^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH $_2$  ( $^{125}\text{I}$ -GHRH) ont mis en évidence la présence de deux sites de liaison du ligand au récepteur: un site à haute affinité ( $K_d$  : 0.68 nM) et de basse capacité ( $B_{\max}$  : 187 fmol/mg de protéine) et un deuxième site à basse affinité ( $K_d$  : 590 nM) mais de haute capacité ( $B_{\max}$  : 52 pmol/mg de protéine) (Aribat et coll., 1990). La liaison du  $^{125}\text{I}$ -GHRH dans des homogénats d'hypophyse est dépendante de la concentration de protéine (entre 15 et 170  $\mu\text{g}$ ) à température ambiante (23°C). La cinétique d'association du  $^{125}\text{I}$ -GHRH atteint l'équilibre après 30 min. d'incubation lequel est maintenu pendant 150 min. supplémentaires. De plus, la liaison de  $^{125}\text{I}$ -GHRH au GHRH-R est réversible. L'addition de 2.4  $\mu\text{M}$  de rGHRH(1-29)NH $_2$  dans le milieu réactionnel à l'équilibre produit une dissociation

biphasique, laquelle est complétée après 120 min. Les constantes d'association et de dissociation sont de 5.01 et de 8.13 nM<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup> respectivement (Atribat et coll. 1990). Des peptides de la sous-famille BIII tel que le VIP, le *peptide histidine isoleucine* (PHI) et la sécrétine n'affecte pas la liaison du <sup>125</sup>I-GHRH à des concentrations de 2.4 µM démontrant la spécificité du ligand pour son récepteur.

Des études de saturation avec le <sup>125</sup>I-GHRH faites dans des préparations membranaires de cellules *baby kidney hamster* (BHK 570) transfectées de façon stable avec le GHRH-R humain (hGHRH-R) hypophysaire ont permis de déterminer les paramètres de liaison de ce radioligand ( $K_d$ : 0.20 nM;  $B_{max}$ : 1.9 pmol/mg de protéine) (données non publiées). La liaison du <sup>125</sup>I-GHRH au hGHRH-R atteint l'équilibre tel que décrit dans les homogénats d'hypophyse de rat. De plus, la liaison du <sup>125</sup>I-GHRH n'est pas inhibée par les peptides GLP-1, glucagon, *growth hormone-releasing peptide 2 et 6* (GHRP-6 et GHRP-2) et par le GIP, démontrant la spécificité du ligand pour son récepteur (Andersen et coll., 1998).

Dans le but d'optimiser l'affinité de liaison, la puissance biologique ainsi que la stabilité métabolique du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> tant *in vitro* qu'*in vivo*, des études pharmacologiques dans des homogénats d'hypophyse de rat ont été réalisées (Gaudreau et coll., 1992). Ainsi, la délétion de Asn<sup>8</sup>, Gln<sup>24</sup>, Asp<sup>25</sup>, Ile<sup>26</sup>, Met<sup>27</sup>, Ser<sup>28</sup> ou Arg<sup>29</sup> du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> résulte en des analogues qui

conservent une affinité de l'ordre du nanomolaire soit entre 7.2 et 45.2 nM (Ling et coll., 1985; Gaudreau et coll., 1992). De ces analogues, seuls ceux comportant une délétion de Met<sup>27</sup> ou de Ser<sup>28</sup> présentent des affinités similaires à celle du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>. De plus, l'analogue [desaminoTyr<sup>1</sup>, D-Ala<sup>2</sup>, Ala<sup>15</sup>]hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>, où la fonction  $\alpha$ -aminée de Tyr<sup>1</sup> est éliminée, où Ala<sup>2</sup> est modifié par son aa de conformation D et où Gly<sup>15</sup> est substitué par Ala, possède une affinité 7.7 fois plus grande que hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> indiquant qu'une modification en position 1 et 2 augmente son affinité (Gaudreau et coll., 1992). Inversement, des délétions uniques d'aa (Tyr<sup>1</sup>, Ser<sup>9</sup>, Lys<sup>12</sup>, Val<sup>13</sup>, Gly<sup>15</sup>, Gln<sup>16</sup> ou Lys<sup>21</sup>) ou multiples (Val<sup>13</sup>, Leu<sup>14</sup>; Val<sup>13</sup>, Leu<sup>14</sup> et Gly<sup>15</sup>; Arg<sup>20</sup> et Lys<sup>21</sup>; Ala<sup>19</sup>, Arg<sup>20</sup> et Lys<sup>21</sup>; Gln<sup>16</sup>, Leu<sup>17</sup>, Ser<sup>18</sup>, Ala<sup>19</sup>, Arg<sup>20</sup> et Lys<sup>21</sup>) provoquent des diminutions drastiques de l'affinité de liaison des analogues en comparaison au hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> (Gaudreau et coll., 1992). Mentionnons également que le rGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> possède une affinité de 1.7 à 7.8 fois supérieure au hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> (Aribat et coll., 1990; Gaudreau et coll., 1992). Cette différence est également présente pour des analogues du rGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> tel que le rGHRH(1-43)OH, le rGHRH(1-27)NH<sub>2</sub> et le rGHRH(1-23)NH<sub>2</sub> car leur puissance de stimulation de la sécrétion *in vitro* de GH est de 3.9, 6.1 et 9.7 fois plus élevée que celle du hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub>, du hGHRH(1-27)NH<sub>2</sub> et du hGHRH(1-23)NH<sub>2</sub>, respectivement (Gaudreau et coll., 1992).

Des études de structure-affinité ont également permis d'identifier les pharmacophores de liaison hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> dans l'hypophyse de rat. Celles-ci

ont mis en évidence les aa cruciaux impliqués dans la liaison au récepteur ou dans le maintien d'une conformation adéquate du ligand pour la liaison au récepteur. Ainsi, les analogues comportant une substitution de Ala<sup>4</sup>, Ile<sup>5</sup>, Phe<sup>6</sup>, Thr<sup>7</sup>, Val<sup>13</sup>, Gln<sup>16</sup>, Leu<sup>17</sup>, Ala<sup>19</sup>, Arg<sup>20</sup> et Ile<sup>26</sup> par leur aa de conformation D, ou ceux comportant une substitution de Tyr<sup>1</sup>, Asp<sup>3</sup>, Ile<sup>5</sup>, Phe<sup>6</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Arg<sup>11</sup>, Lys<sup>12</sup>, Leu<sup>14</sup>, Leu<sup>17</sup>, Arg<sup>20</sup> et Lys<sup>21</sup> par une alanine favorisent les diminutions d'affinité les plus importantes (Lefrançois et coll., 1994). De ces faits, les auteurs concluent que les aa Ala<sup>4</sup>, Val<sup>13</sup>, Ala<sup>19</sup> et Ile<sup>26</sup> sont impliqués dans le maintien de la conformation optimale du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>, alors que les aa Tyr<sup>1</sup>, Asp<sup>3</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Arg<sup>11</sup>, Lys<sup>12</sup>, Leu<sup>14</sup>, Leu<sup>17</sup>, Arg<sup>20</sup> et Lys<sup>21</sup> sont importants pour la liaison au récepteur. Les résidus Ile<sup>5</sup> et Phe<sup>6</sup> seraient importants pour les deux paramètres (Lefrançois et coll. 1994). De plus, les pharmacophores d'activation, provoquant la plus forte accumulation d'AMPc intracellulaire, sont identiques aux pharmacophores de liaison mentionnés (Lefrançois et coll., 1994). Sato et coll. (1987) ont également établi une corrélation avec le potentiel des analogues à induire la sécrétion de GH, par l'affinité relative calculée en considérant le ratio de l'IC<sub>50</sub> du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> sur celui de l'analogue. Les pharmacophores où Asn<sup>8</sup> est substitué par son aa de conformation D ou par une alanine, et où Leu<sup>22</sup> est substitué par une alanine induisent une sécrétion de GH (171, 229 et 131% respectivement) supérieure à celle engendrée par le hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> (Sato et coll., 1987). D'autres études ont montré que, par exemple, l'analogue [D-Ala<sup>2</sup>]hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> permettait d'augmenter de 81% (Campbell et coll., 1991) ou de 5046% (Coy et coll., 1985; Rafferty et coll., 1988) la sécrétion de GH, par



rapport au hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>.

Pour le GHRH-R humain exprimé dans les cellules BHK, des études de saturation ont également permis d'identifier les résidus impliqués dans la liaison au récepteur ou dans le maintien d'une conformation adéquate du ligand pour sa liaison au récepteur. Ainsi, les pharmacophores impliqués dans la liaison du ligand au récepteur sont Leu<sup>14</sup> et Leu<sup>17</sup>, les pharmacophores impliqués dans la conformation du ligand pour la liaison au récepteur sont Phe<sup>6</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Val<sup>13</sup> et Ala<sup>19</sup> alors que Arg<sup>20</sup> est importante pour les deux paramètres (données non publiées). Plusieurs analogues du hGHRH (hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>, hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub>, hGHRH(1-40)OH, hGHRH(1-37)OH) ainsi que le rGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> possèdent une haute affinité de liaison, avec des affinités de 0.2 à 0.8 nM (Andersen et coll., 1998; données non publiées). De plus, l'activation de ce récepteur stimule la voie adénylate cyclase et provoque l'accumulation d'AMPc intracellulaire de façon agoniste dépendante, avec des EC<sub>50</sub> de 0.2 à 1.0 nM pour les ligands mentionnés ci-haut (Andersen et coll., 1998; données non publiées).

En plus, des études de réticulation chimique ont permis de caractériser les complexes ligand-GHRH-R. Les premières études faites dans l'hypophyse antérieure bovine et de rat ont révélé la présence de complexes de 31 et 75 kDa, respectivement, avec le [<sup>125</sup>I]hGHRH(1-40)OH (Veliçelebi et coll., 1986), de 26 kDa avec le [His<sup>1</sup>, Nle<sup>27</sup>]hGHRH(1-32)NH<sub>2</sub> dans l'hypophyse de rat (Zysk et coll.,

1986) et de 27 et 42 kDa dans l'hypophyse de rat avec le [ $^{125}$ I]hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub> (Guarcello et coll., 1991). D'autres études chez le rat ont permis la détection de complexes spécifiques de 27, 47 et 65 kDa dans l'hypophyse antérieure de rat avec le [ $^{125}$ I-Tyr<sup>10</sup>]hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub> (Boulanger et coll., 1999). Chez l'humain, les études de réticulation chimique avec ce même ligand, dans des préparations membranaires de cellules BHK 570 transfectées avec le GHRH-R humain ont révélées la présence de complexes de 35, 45 et 72 kDa (Boulanger et coll., 1999). Une diminution plus grande du signal radioactif du complexe de 45 kDa a été observée en présence de 1  $\mu$ M du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>, suggérant une affinité plus grande du GHRH pour cette entité (Boulanger et coll., 1999). Par ailleurs, Gaylinn, Lyons et coll. (1994) ont identifié par réticulation chimique à l'aide d'un radioligand photoactivable par UV, le [ $^{125}$ I, His<sup>1</sup>, Nle<sup>27</sup>](ANB-NOS)hGHRH(1-32)NH<sub>2</sub> (ANB-NOS : *UV-activatable heterobifunctional cross-linking reagent*), un complexe de 55 kDa dans des préparations membranaires de cellules HEK 293 transfectées avec le hGHRH-R. Finalement, le développement d'un analogue photoréactif du hGHRH(1-32)NH<sub>2</sub> a permis d'identifier des complexes radioactifs de 55 et 57 kDa dans l'hypophyse de mouton et de bœuf, respectivement. La taille moléculaire apparente de ces complexes radioactifs est réduite à 45 et 47 kDa après déglycosylation (Zysk et coll., 1996).

Une protéine de 50 ou de 54 kDa a été identifiée dans les hypophyses humaines et de rat respectivement par immunodétection, à l'aide d'un anticorps dirigé contre la portion C-terminale (aa 404-421) du GHRH-R (Fujinaka et coll.,

1996). De plus, Boulanger et coll. (1999) ont identifié une entité de 45 kDa dans les cellules BHK 570 transfectées avec le hGHRH-R, des entités de 44, 47 et 65 kDa dans l'hypophyses de rat et des entités de 52 et 55 kDa dans l'hypophyse humaine à l'aide d'un anticorps dirigé contre la portion C-terminale (aa 392-404) du GHRH-R.

#### **1.2.5.2 Récepteur extrahypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance**

Des études de saturation avec le ligand [ $^{125}\text{I}$ -Tyr $^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH $_2$  ont mis en évidence la présence d'un site de liaison pour le GHRH-R dans la médulla de rein de rat ( $K_d$  : 28 nM;  $B_{\max}$  : 30 fmol/mg de protéine) (Boulanger et coll., 2002). La liaison spécifique du  $^{125}\text{I}$ -GHRH augmente de façon linéaire avec la concentration de protéine. De plus, l'association du  $^{125}\text{I}$ -GHRH au GHRH-R est dépendante du temps à 4°C, atteignant l'équilibre après 15 min. et demeurant stable durant 90 min. subséquemment. L'état d'équilibre ne peut être atteint lorsque l'incubation est faite à 23°C, tel que dans le cas des homogénats d'hypophyse. Notons que pour les homogénats d'hypophyse, l'équilibre est atteint après 30 min. d'incubation à 4°C. Cette liaison du  $^{125}\text{I}$ -GHRH est également réversible, avec une dissociation rapide du radiologand suite à l'addition à l'équilibre de 1  $\mu\text{M}$  de rGHRH(1-29)NH $_2$  et est complète après 120 min. d'incubation supplémentaire. Une différence importante au niveau des essais de liaison dans l'hypophyse et la médulla rénale est l'utilisation de plusieurs inhibiteurs de protéases, où le taux de liaison spécifique est d'environ

20% sans cette mesure (Boulanger et coll., 2002). La spécificité de liaison du  $^{125}\text{I}$ -GHRH au GHRH-R dans la médulla de rein a été démontrée avec le VIP et le GHRP-6 respectivement, inhibant  $\approx 56\%$  et  $25\%$  de la liaison spécifique à une concentration de 1 mM, mais n'ayant aucun effet significatif à concentrations plus faibles (Boulanger et coll., 2002).

L'affinité de liaison de plusieurs analogues et fragments du GHRH a été évaluée afin de générer un profil de structure-affinité du site de liaison du GHRH-R rénal, pouvant être comparé à celui du récepteur hypophysaire. Par exemple, des modifications en N-terminal du rGHRH(1-29) $\text{NH}_2$  apparaissent comme étant moins délétères pour l'affinité du ligand dans la médulla de rein que dans l'hypophyse antérieure ; l'affinité de l'analogue  $\text{N}\alpha\text{-Ac}[\text{D-Arg}^2, \text{Ala}^{15}]\text{rGHRH}(1\text{-}29)\text{NH}_2$  est plus grande dans la médulla rénale que dans l'hypophyse antérieure ( $\text{IC}_{50}$  de 3 et 70 nM respectivement à  $4^\circ\text{C}$ ), de même que pour rGHRH(3-29) $\text{NH}_2$  (Boulanger et coll., 2002). Des modifications au niveau de la structure primaire centrale du ligand semblent également moins délétères dans la médulla de rein que dans l'hypophyse ; la substitution de  $\text{Val}^{13}$  par son stéréoisomère de forme D entraîne une diminution d'affinité moins drastique dans la médulla (3.7 fois) que dans l'hypophyse (absence d'affinité) (Boulanger et coll., 2002). Enfin, même des délétions en C-terminal tel que dans le hGHRH(1-21) $\text{NH}_2$  induit une diminution moins substantielle (5.3 fois) de l'affinité dans la médulla que dans l'hypophyse (absence d'affinité) (Boulanger et coll., 2002). Ainsi, les différences de profil de structure-affinité suggèrent qu'il pourrait y avoir des différences

structurales au niveau du site de liaison du GHRH entre les GHRH-R des deux tissus, ou au niveau d'autres domaines du récepteur pouvant influencer la conformation du site de liaison (Boulanger et coll., 2002).

Des études de réticulation chimique en présence du ligand [ $^{125}$ I]-Tyr $^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH $_2$  ont permis de détecter des complexes protéiques de 38, 55 et 65 kDa dans la médulla rénale de rat, comparativement à ceux de 28, 47 et 65 kDa dans l'hypophyse antérieure (Boulanger et coll., 2002). Comme la protéine de 47 kDa représente un récepteur fonctionnel de 423 aa dans l'hypophyse, la protéine rénale de 55 kDa pourrait correspondre à une forme glycosylée du récepteur, tel que rapporté dans l'hypophyse bovine et ovine (Gaylinn et coll., 1994). La protéine de 65 kDa pourrait également être une forme glycosylée ou une isoforme plus longue du récepteur. Quant à la protéine de 38 kDa, elle pourrait résulter d'une protéolyse du complexe  $^{125}$ I-GHRH-R-GHRH durant le processus de réticulation (Boulanger et coll., 2002). La taille apparente du récepteur rénal, tel que révélée par immunobuvardage Western est de 52 kDa (Fujinaka et coll., 1996).

Dans la rate et le thymus, des études de réticulation chimique avec  $^{125}$ I-GHRH ont permis de détecter des complexes protéiques de 27 et 42 kDa, tel que dans l'hypophyse (Guarcello et coll., 1991). L'intensité de ces bandes est diminuée lorsque la préparation est incubée en présence de rGHRH(1-29)NH $_2$  (Guarcello et coll., 1991), démontrant leur spécificité pour le GHRH.

### **1.2.6. Voies de signalisation du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance**

La liaison du GHRH à son récepteur constitue l'étape première menant au déclenchement d'une cascade de signalisation intracellulaire, à la synthèse et à l'exocytose de la GH dans les cellules somatotropes. Le GHRH a été isolé à partir de tumeurs pancréatiques prélevées chez des acromégales (Sassolas et coll., 1983; Thorner et coll., 1982) sous trois formes : le GHRH(1-40)OH, le GHRH(1-37)OH et le GHRH(1-44)NH<sub>2</sub> (Guillemin et coll., 1982; Rivier et coll., 1982). Les deux formes les plus courtes sont identiques aux 40 et 37 premiers aa du GHRH(1-44)NH<sub>2</sub>, respectivement (Guillemin et coll., 1982), alors que la forme (1-44) est identique au GHRH hypothalamique et représente la forme prédominante. Les fragments constitueraient des produits de dégradation (Böhlen et coll., 1983; Ling et coll., 1984). La structure primaire du GHRH a également été déterminée chez plusieurs autres mammifères incluant le porc (Bohlen et coll., 1983), la chèvre (Brazeau et coll., 1984), le bœuf (Esch et coll., 1983), le mouton (Brazeau et coll., 1984), le rat (Mayo et coll., 1985; Spiess et coll., 1983) et la souris (Frohman et coll., 1989; Suhr et coll., 1989).

Dans la somatotrope, la voie de signalisation principale du GHRH-R est AMPc-dépendante et implique l'activation d'une protéine G stimulatrice (G<sub>s</sub>) et de l'adénylate cyclase (Mayo et coll., 1992; Gaylinn et coll., 1993). L'augmentation des niveaux d'AMPc intracellulaire, par l'adénylate cyclase, favorise l'activation de la sous-unité catalytique de la protéine kinase A (PKA). Celle-ci induit la

phosphorylation de la sérine 33 du facteur de transcription CREB (Grewal et coll., 2000; Shaywitz et coll., 1999; Sheng et coll., 1991; Gonzalez et coll., 1989). Ce facteur entraîne l'expression d'un autre facteur de transcription, Pit-1 spécifique à l'hypophyse (Kishimoto et coll., 2002; Xu et coll., 1998; McCormick et coll., 1990; Bodner et coll., 1988; Ingraham et coll., 1988), qui est responsable de la transcription des gènes de la GH et du GHRH-R. Cet événement mène ensuite à une augmentation de la concentration de GH (protéine) dans la somatotrope, emmagasinée dans les vésicules de sécrétion, ainsi que du GHRH-R (Sekkali et coll., 1999; Lin et coll., 1992; Salvatori et coll., 2002). En effet, la stimulation par le GHRH active également, *via* l'AMPc, des canaux sodiques insensibles à la tétrodontoxine ou des canaux cationiques non-sélectifs conduisant à une dépolarisation et à l'ouverture de canaux calciques (Kato et coll., 1992 ; Chen et coll., 2000; Sartin et coll., 1996). Ceci résulte en une entrée et une accumulation d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans la cellule, entraînant la sécrétion de la GH contenu dans les granules de sécrétion (Glavaski-Joksimovic et coll., 2002; Cuttler et coll., 1992; Lussier et coll., 1991).

Une seconde voie menant à la sécrétion de la GH dans les cellules somatotropes implique deux produits originant du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) : le 1,2-diacylglycérol (DAG) et le 1,4,5-inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ). Ces messagers sont générés par l'action de la phospholipase C. Le DAG permet l'activation de la protéine kinase C (PKC) qui entraîne une augmentation des niveaux d'AMPc intracellulaire. Cette augmentation favorise, comme dans le

cas de l'adénylate cyclase, l'augmentation de l'influx calcique dans la cellule (Gordeladze et coll., 1989; Cronin et coll., 1986; Cronin et coll., 1985; French et coll., 1989; Ray et coll., 1988). L' $IP_3$  favorise la mobilisation des réserves intracellulaires de  $Ca^{2+}$  (Biden et coll., 1984). Ces deux derniers événements mènent à la sécrétion de la GH (Lussier et coll., 1991; Cuttler et coll., 1992). Des études *in vitro* menées avec des analogues du diacylglycérol et des esters de phorbol ont d'ailleurs démontré qu'une stimulation de la PKC entraîne la sécrétion de GH dans des cellules d'hypophyse antérieure (Judd et coll., 1986; Ohmura et coll., 1985; Koch et coll., 1988).

Récemment, il a également été proposé que le GHRH active la voie des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) et serait impliqué dans les activités de prolifération cellulaire des cellules somatotropes (Pombo et coll., 2000; Zeitler et coll., 2000; Lee et coll., 2001). En effet, une importante phosphorylation d'intermédiaires de la voie MAPK a été mise en évidence suite à une stimulation des somatotropes par le GHRH (Zeitler et coll., 2000). De plus, l'activation de la voie MAPK est prévenue suite à une stimulation par un analogue de la somatostatine ou un inhibiteur de la MEK1 (Zeitler et coll., 2000), ou lorsque la protéine  $G\beta\gamma$  est séquestrée par la transducine (Pombo et coll., 2000).



### **1.2.7. Localisation tissulaire du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance**

La somatotrope représente le seul type cellulaire hypophysaire où le GHRH-R est exprimé (Mayo, 1992; Morel et coll., 1999). L'ARNm du récepteur a été colocalisé avec l'ARNm du facteur de transcription Pit-1 (Mayo, 1992; Lin et coll., 1992). Notons que la transcription du gène du GHRH-R est dépendante du facteur de transcription Pit-1 (Lin et coll., 1992). Le transcrit de 2.5 kb décrit est majeur dans l'hypophyse de rat de deux mois (~80%) alors que les transcrits de 3.1 à 4 kb du GHRH-R y sont présents en moins grande concentration (~20%) (Mayo, 1992; Lin et coll., 1993). Des transcrits de 2, 2.8 et 4.5 kb ont été identifiés dans les hypophyses normales et des adénomes hypophysaires humains (Hashimoto et coll., 1995). La concentration des transcrits de plus haut poids moléculaires est augmentée significativement dans ces adénomes (Hashimoto et coll., 1995).

Peu de données existent sur le GHRH-R dans les tissus extrahypophysaires. L'ARNm du GHRH-R a été détectée par RT-PCR dans le cortex cérébral, le cervelet, l'hypothalamus, le tronc cérébral, la glande thyroïde, le cœur, le poumon, le duodénum, l'intestin grêle, le colon, la rate, la glande surrénale, le rein (médulla, cortex, bassinet), l'urètre, l'épididyme et les muscles squelettiques (Matsubara et coll., 1995). Il n'a pas été détecté dans l'estomac, le foie, les testicules, les ovaires, le placenta et le tissu adipeux (Matsubara et coll., 1995). Aucune étude d'immunodétection du GHRH-R n'a été rapportée

dans ces tissus extrahypophysaires, sauf dans la médulla rénale (Fujinaka et coll., 1996; Boisvert et coll., 2002). Ce tissu constitue le seul tissu extrahypophysaire contenant une concentration d'ARNm permettant sa détection sans amplification (Matsubara et coll., 1995; Boisvert et coll., 2002). C'est dans les cellules de l'anse de Henlé que la concentration d'ARNm du GHRH-R, détecté par RPA et hybridation *in situ*, est la plus élevée (Boisvert et coll., 2002). Des transcrits d'ARNm du GHRH-R de 2.5 et 4kb y sont retrouvés tel que dans l'hypophyse antérieure. Toutefois, les niveaux de transcrits y sont de 1.3 (4kb) et 2.3 (2.5 kb) fois plus faible (Boisvert et coll., 2002). La séquence partielle du GHRH-R rénal révèle une homologie complète avec le GHRH-R hypophysaire (Matsubara et coll., 1995).

Dans les noyaux périventriculaire, arqué et ventromédial de l'hypothalamus ainsi que dans la région antérieure de l'hypothalamus, un produit de PCR de 564 pb a été détecté chez le rat (Takahashi et coll., 1995). Ce produit est de taille plus faible que celui identifié dans l'hypophyse antérieure chez la même espèce. Il a également été retrouvé en faible concentration dans le cortex cérébral, par hybridation *in situ* (Takahashi et coll., 1995). Enfin, l'ARNm correspondant au GHRH-R de 423 aa a été détectée dans la région préoptique du cerveau de rat (Obal et coll., 2001).

### 1.2.8. Rôles du récepteur du facteur de libération de l'hormone de croissance

Dans l'hypophyse antérieure, le GHRH-R est impliqué dans la synthèse et la sécrétion de la GH (Kovacs et coll., 2002) ainsi que dans la prolifération des cellules somatotropes par un mécanisme AMPc-dépendant. La mise en évidence d'une hyperplasie des cellules somatotropes chez des animaux transgéniques surexprimant le GHRH (Mayo et coll., 1988) ainsi qu'une réduction de la quantité de ce type cellulaire suite à la surexpression d'un mutant inactif de CREB (Struthers et coll., 1991) ou chez les souris *dwarf* (Lin et coll., 1993; Lin et coll., 1992) renforcent ce rôle. La mise en évidence de la stimulation de l'expression du gène *c-fos* dans des cellules somatotropes de rat en culture primaire, appuie également un tel rôle (Billestrup et coll., 1987). De plus, les études démontrant l'activation de la voie MAPK (voie inductrice de la prolifération cellulaire) par le GHRH, dans les cellules somatotropes de rat, appuient également ce rôle du GHRH-R (Zeitler et coll., 2000; Pombo et coll., 2000). Finalement, le GHRH-R pourrait être impliqué dans la différenciation des cellules somatotrophes au cours du développement embryonnaire chez les mammifères (Dean et coll., 1999).

Dans les tissus extrahypophysaires, les rôles potentiels du GHRH-R et de ses isoformes sont nombreux. Les isoformes décrits par Rekasi et coll. (2000) médieraient les effets antiprolifératifs d'analogues du GHRH entre autre dans les ostéosarcomes, les glioblastomes, les carcinomes du poumon, du rein, de la

prostate, du pancréas, du colon, des ovaires et du sein chez l'humain. Le GHRH-R exercerait un rôle somnogénique au niveau des régions préoptique et olfactive de l'hypothalamus (Obal et coll., 2001; Zhang et coll., 1999; Obal et coll., 1991) et sur l'appétit au niveau du noyau supraquiasmatique (Vaccarino et coll., 1986). Il est rapporté qu'une administration intracérébroventriculaire de GHRH augmente la prise de nourriture chez le rat (Vaccarino et coll., 1986) et qu'une injection intrapréoptique de GHRH altère le sommeil chez la même espèce (Zhang et coll., 1999). Le GHRH, par l'entremise de son récepteur régule sa propre sécrétion au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus (Lumpkin et coll., 1989). Il a également été rapporté que le GHRH-R médie une stimulation directe de la synthèse et de la sécrétion de somatostatine par le GHRH dans le noyau périventriculaire de l'hypothalamus (Aguila et coll., 1994; West et coll., 1997; Aguila et coll., 1985).

Chez l'humain et le rat, l'ARNm du preproGHRH et le GHRH ainsi que celui du GHRH-R sont présents au niveaux du testicule (Berry et coll., 1992; Berry et coll., 1988; Ciampani et coll., 1992), où le GHRH agirait possiblement comme facteur de régulation propre aux gonades (Fabbri et coll., 1995). Dans le testicule de rat, le GHRH est retrouvé dans les cellules de Leydig (Ciampani et coll., 1992) et les cellules germinales (Srivastava, Collard et coll., 1993). Le GHRH permettrait de moduler la stéroïdogénèse stimulée par les gonadotrophines dans les cellules de Leydig en culture et de stimuler la production d'AMPc et l'expression du gène *c-fos* dans les cellules de Sertoli en

culture (Ciampani et coll., 1992; Srivastava, Breyer et coll., 1993). Vu l'existence d'une barrière hémato-testiculaire, le GHRH agirait comme facteur autocrine ou paracrine (Prescovitz et coll., 1990).

Au niveau des cellules l'anse de Henlé de la médulla rénale, le GHRH-R aurait probablement un rôle dans le contrôle de l'oxygénation, le transport d'électrolytes de façon directe et dans l'expression ou la régulation de la fonction de protéines impliquées dans le processus de concentration de l'urine (Boisvert et coll., 2002; Matsubara et coll., 1995). Le GHRH-R pourrait également médier, comme dans les somatotropes, la prolifération et/ou la différenciation cellulaire des cellules de l'anse de Henlé (Boisvert et coll., 2002).

De plus, le GHRH-R permettrait l'expression de gènes importants comme celui du *peptide-23/pancreatitis associated protein* et de la *pancreatic stone protein/regeneratin protein* au niveau du duodénum et du jéjunum de l'appareil gastrointestinal ainsi qu'au niveau du pancréas (Chakraborty et coll., 1995), en plus de favoriser la prolifération de la muqueuse gastroduodénale (Konturek et coll., 1988).

Enfin, le GHRH-R pourrait médier plusieurs fonctions immunitaires au niveau de la rate et du thymus. Un rôle possible a été observé aussi dans la prolifération leucocytaire et lymphocytaire au niveau de la rate et du thymus (Guarcello et coll., 1991). Une incubation des leucocytes avec du GHRH résulte

en une augmentation concentration-dépendante de l'incorporation de thymidine et uridine tritiée et du niveau d'ARNm de la GH dans leur cytoplasme (Guarcello et coll., 1991).

### **1.3 Justification de l'étude**

Chez plusieurs espèces, tel que le rat (Mayo, 1992 ; Zeitler et coll., 1998), l'humain (Tang et coll., 1995 ; Hashimoto et coll., 1995 ; Rekasi et coll., 2000), la brebis (Horikawa et coll., 2001) et le porc (Hsiung et coll., 1993), des isoformes du GHRH-R ont été décrites soit dans des cellules hypophysaires et/ou extrahypophysaires normales et/ou tumorales. Chez le rat, le GHRH-R natif comporte 423 aa et constitue un récepteur fonctionnel à haute affinité pour le GHRH (Mayo, 1992; Zeitler et coll., 1998). Deux isoformes du GHRH-R ont été décrites dans l'hypophyse de cette espèce: une isoforme de 464 aa identique au récepteur de 423 aa, possédant une insertion de 41 aa au niveau de la troisième boucle intracytoplasmique (Mayo, 1992; Miller et coll., 1999); une isoforme identique à celle de 464 aa mais comportant une délétion des 5 derniers aa ainsi qu'une addition de 16 aa en C-terminal (Zeitler et coll., 1998). Peu d'information existe sur le rôle des deux isoformes en condition physiologique ou pathologique. Les résultats actuels démontrent que les isoformes et le récepteur natif sont présents à des concentrations différentes dans l'hypophyse (Mayo, 1992; Zeitler et coll., 1998; Miller et coll., 1999) et possèdent des affinités et fonctionnalité dissemblable. Ces paramètres pourraient donc contribuer à des états physiopathologiques tel que le vieillissement et à la prolifération tumorales

hypophysaires ou extrahypophysaires. Les évidences suggérées au cours du vieillissement chez le rat (Ceda et coll., 1986 ; Deslauriers et coll., 1991 ; Sonntag et coll., 1980 ; Takahashi et coll., 1987) et l'humain (Finkelstein et coll., 1972; Ho et coll., 1987 ; Lang et coll., 1987 ; Corpas et coll., 1993 ; Rudman et coll., 1985), concernent une diminution de la sensibilité des cellules somatotropes au GHRH et par conséquent, de la concentration circulante de GH. Cette diminution est attribuable à des modifications des paramètres de liaison du GHRH à son récepteur hypophysaire (Gaudreau et coll., 1999; Abribat et coll., 1991; Lefrançois et coll., 1995). Par ailleurs, des résultats récents ont révélé la présence de modifications des ratios d'isoformes au niveau de plusieurs carcinomes humain (Rekasi et coll., 2000; Busto et coll., 2002; Plonowski et coll., 2002). Par conséquent, une caractérisation individuelle des isoformes connues du GHRH-R hypophysaire de rat s'avère nécessaire afin de déterminer leur profil de structure-affinité, et à plus long terme leur profil de structure-activité et leur contribution à un état physiopathologique qui affecterait le profil structure fonction du GHRH-R natif.

Le premier objectif de l'étude a donc été de développer un système d'expression pour le GHRH-R natif et chacune de ses isoformes (type cellulaire, conditions de transfection, culture cellulaire). Les systèmes d'expression développés serviront de modèles purs pour le test et la validation d'analogues du GHRH pouvant remplir le rôle d'agoniste ou d'antagoniste pour l'une ou l'autre des formes du rGHRH-R.

Le deuxième objectif de l'étude a été d'établir le profil de structure-affinité du récepteur natif avec des analogues Ala- et D-monosubstitués du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> et d'identifier les pharmacophores de liaison du GHRH pour le rGHRH-R. Des études de structure-affinité avec ces mêmes analogues ont été effectuées dans des homogénats d'hypophyse de rats, exprimant les trois formes du GHRH-R. Des comparaisons entre les deux profils pharmacologiques permettront de déterminer la contribution de la forme native du GHRH-R dans les cellules somatotropes au profil pharmacologique global. Cette étude permettra à moyen terme d'identifier des agonistes et/ou antagonistes pouvant avoir un effet ciblé sur des isoformes du GHRH-R, ce qui pourrait modifier la réponse optimale au GHRH dans des tissus cibles.



## **2. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

## 2.1 Matériels

Les enzymes de restriction *Bam*HI, *Hind*III, *Eco*RI, *Pst*I et la *T4* ADN ligase, les tampons de digestion React 2, 3 et de ligation utilisés avec *Pst*I, *Eco*RI et la *T4* DNA ligase respectivement, les bactéries *Escherichia Coli* (*E. Coli*) DH5 $\alpha$ , la lipofectamine ainsi que l'ampicilline, l'agarose, le glycérol, le TRIzol, le citrate de sodium et le fragment de Klenow de l'ADN polymérase de *E. Coli*. provenaient de la compagnie Invitrogen Life Technologies (Burlington, ONT, CA). Les enzymes de restriction *Xba*I et *Sca*I, le ligand [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>10</sup>]hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub> (2,000 Ci/mmol), le tampon One-Phor-All 2X utilisé pour la digestion *Eco*RI/*Sca*I, le sulfate de Dextran, l' $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]UTP, le [<sup>32</sup>P]deoxy-CTP et la colonne de chromatographie G-50 ont été obtenus de la compagnie Amersham Biosciences (Baie d'Urfé, QC, CA) alors que l'enzyme de restriction *Msc*I et son tampon de digestion NEB#4 provenaient de la compagnie New England Biolabs (Mississauga, ONT, CA). Le xylène cyanol, le diméthyl sulfoxide (DMSO), l'acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique (MOPS) et le polyvinylpyrrolidone ont été obtenus de ICN Biomedicals Inc. (Montréal, QC, CA). La trousse QIAfilter Plasmid Maxi a été obtenu de QIAGEN Inc. (Mississauga, ONT, CA). Le bacto-tryptone, l'extrait bacto-levure et le bacto-agar provenaient de Difco (Kansas City, MO, USA). Le NaCl et la paraformaldéhyde ont été obtenus de la compagnie Anachemia Biosciences (Lachine, QC, CA). La trousse de transcription MAXIscript, la trousse RPA II, le vecteur p-TRI-GAPDH et la formamide provenaient de la compagnie Ambion Inc. (Austin, TX, USA). Les filtres GF/B Whatman, les lames de verre prénettoyées de type Superfrost/Plus

(immunocytochimie) et la formaldéhyde ont été obtenus de la compagnie Fisher Scientific Ltd (Nepean, ONT, CA). L'acétate de sodium provenait de JT Baker (Montréal, QC, CA). Les films Biomax Ms-1 ont été obtenus de Eastman Kodak Co. (Rochester, NY, USA). Les membranes de nylon Genescreen provenaient de New England Nuclear Bioscience (Boston, MA, USA).

Le milieu de culture Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) et OPTI-modified Eagle's medium (OPTI-MEM), la pénicilline (10,000 U/ml)/streptomycine (10,000 µg/ml), le sérum fœtal bovin (FBS) et la généticine (G418) provenaient de la compagnie Invitrogen Life Technologies. Le réactif de Bradford, le bleu de bromophénol, l'acrylamide, l'urée et le SDS ont été obtenus de la compagnie Bio-Rad Laboratories (Mississauga, ONT, CA). L'albumine sérique bovine (BSA), l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), le dichlorure de magnésium (MgCl<sub>2</sub>), le sucrose, le Triton X-100 et la fillipine III provenaient de Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, ONT, CA). Le Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane provenait de la compagnie Sigma-Aldrich Canada Ltd. Tous les analogues synthétiques du GHRH(1-29)NH<sub>2</sub> humain comportant une substitution D- ou Ala- ont été synthétisés, purifiés et caractérisés dans le laboratoire du D<sup>r</sup> P. Gaudreau (Lefrançois et coll., 1994). Leur pureté a été réanalysée par chromatographie liquide à haute pression avant leur utilisation dans la présente étude et était  $\geq$  97%. L'anticorps anti-GHRH-R(392-404) a été utilisé (Boulanger et coll., 1999). L'anticorps secondaire de chèvre anti IgG de lapin couplé au fluorochrome Texas red provenait de la compagnie Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Le ligand

fluorescent [N<sup>α</sup>-5-carboxyfluoresceinyl-D-Ala<sup>2</sup>, Ala<sup>8</sup>, Ala<sup>15</sup>, Lys<sup>22</sup>]hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> (Fluo-GHRH) a été synthétisé dans le laboratoire du D<sup>r</sup> P. Gaudreau (Veyrat-Durebex et coll., 2003).

## 2.2 Systèmes d'expression

Les ADNc RPR18c et RPR2c ont été fournis par le D<sup>r</sup> K. Mayo (Department of biochemistry, molecular biology and cell biology, Northwestern University, Evanston, IL) dans le plasmide d'expression pcDNA1 alors que les ADNc GHRH-R $\alpha$  et GHRH-R $\beta$  ont été fournis par le D<sup>r</sup> P. Zeitler (Department of Pediatrics, University of Colorado, Denver, CO) dans le plasmide d'expression pcDNA3.1. Les ADNc RPR2c et RPR18c ont été excisés du vecteur pcDNA1 par digestion à l'aide des enzymes de restriction *HindIII* et *XbaI* (0.2U/ $\mu$ l/ $\mu$ g d'ADN de *HindIII*, 0.3U/ $\mu$ l/ $\mu$ g d'ADN de *XbaI*, 10% v/v React2 par rapport au volume total, 1h, 37°C), isolés sur gel d'agarose 0.8% et purifiés à l'aide de la trousse QIAfilter Plasmid Maxi. Le plasmide d'expression pcDNA3.1 linéaire, nécessaire au clonage de RPR18c et RPR2c, a été obtenu à partir de la construction pcDNA3.1-GHRH-R $\beta$ , par digestion *HindIII/XbaI* (mêmes conditions que la digestion précédente), séparation sur gel d'agarose 0.8% et purification à l'aide de la trousse QIAfilter Plasmid Maxi. Ces enzymes ont été choisis pour leur site de restriction unique dans le site de polyclonage de pcDNA3.1 et pcDNA1. Les ADNc RPR2c et RPR18c ont été clonés dans le site *HindIII/XbaI* de pcDNA3.1 (0.1U/ $\mu$ l/ $\mu$ g d'ADN de T4 ADN ligase, 20% v/v tampon de ligation par rapport au volume total, 16hs, 16°C). Chaque construction a ensuite été

transformée par choc thermique dans la souche bactérienne *E.Coli*. DH5 $\alpha$  et sélectionnée sur un milieu Luria Bertani (LB) agar (10g de bacto-tryptone, 5g d'extrait de bacto-levure, 10g NaCl, 15g bacto-agar, (pH 7.0 ajusté avec 5N NaOH) complété à 1 L avec de l'eau picopure) contenant 100  $\mu$ g/ml d'ampicilline durant 12 h à 37°C. Les colonies sélectionnées ont ensuite été amplifiées dans du milieu LB pendant 12 h à 37°C et l'ADN en a été purifié à l'aide de la trousse QIAfilter Plasmid Maxi.

Le plasmide d'expression Zem219b fourni par le D<sup>r</sup> D. C. Foster (Zymogenetics inc., Washington, USA) a été isolé à l'aide des enzymes *Bam*HI/*Xba*I (0.2u/ $\mu$ l/ $\mu$ g d'ADN de *Bam*HI, 0.3u/ $\mu$ l/ $\mu$ g d'ADN de *Xba*I, 10% v/v de React2 par rapport au volume total, 1h, 37°C), séparé sur un gel d'agarose 0.8% et purifié à l'aide de la trousse QIAfilter Plasmid Maxi. Pour le clonage des ADNc RPR18c, RPR2c et GHRH-R $\beta$  dans Zem219b, ceux-ci ont été excisés de leur construction respective dans pcDNA3.1 par les enzymes de restriction *Bam*HI/*Xba*I, séparés et purifiés de la manière décrite pour Zem219b et clonés séparément dans le site *Bam*HI/*Xba*I de Zem219b (0.1u/ $\mu$ l/ $\mu$ g d'ADN de T4 ADN ligase, 20% v/v de tampon de ligation par rapport au volume total, 16h, 16°C).

L'identité structurale des constructions a été vérifiée par digestion enzymatique ainsi que par analyse de séquence. Chaque construction dans pcDNA3.1 a été digérée avec les enzymes de restriction *Eco*RI, *Sca*I, *Msc*I et *Pst*I (0.2u/ $\mu$ l/ $\mu$ g d'ADN d'enzyme, 10% v/v React2 par rapport au volume total,

1h, 37°C) alors que celles dans Zem219b l'ont été avec les enzymes de restriction *EcoRI*, *ScaI* et *PstI*, et révélé par électrophorèse sur gel d'agarose 1.2%. Les analyses de séquence ont été effectuées par le Service d'analyse et de synthèse d'acides nucléiques de l'Université Laval (Québec, QC, CA). Une amorce en amont du site d'initiation de la transcription dans le promoteur cytomégalovirus (CGC AAA TGG GCG GTA GGC GTG) ainsi qu'une amorce en aval du codon STOP (TAG AAG GCA CAG TCG AGG) ont été utilisées (ACGT Corp., Northbrook, IL, USA). Elles ont été choisies pour leur stabilité d'appariement et leur site unique d'appariement dans la séquence nucléotidique du plasmide d'expression pcDNA3.1. Chaque séquence d'isoforme obtenue a été comparée avec sa séquence théorique retrouvée dans la base de données GenBank du National Institute of Health (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Le code d'accès de chaque isoforme était le suivant : AF122055 pour GHRH-R $\beta$  (Zeitler et coll., 1998), L01407 pour GHRH-R $\alpha$  et RPR18c (Zeitler et coll., 1998; Mayo et coll., 1992). La séquence de RPR2c n'est pas répertoriée sur GenBank (Mayo et coll., 1992). Le programme *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) du National Institute of Health a permis de comparer les séquences (séquences analysées aux séquences théoriques) afin de vérifier leur homologie.

### 2.3 Conditions de transfections

Les cellules épithéliales humaines d'adénocarcinome du col de l'utérus (HeLa) et des cellules rénales humaines (*human embryonic kidney cells*; HEK 293) ont été obtenues de la compagnie American Type Culture Collection

(Manassas, VA, USA). Les cellules *Baby Kidney Hamster* (BHK 570) sauvages et transfectées de façon stable avec le hGHRH-R ont été obtenues du D<sup>r</sup> P.H. Andersen (Novo Nordisk, Måløv, Denmark). Les transfections stables ont été effectuées dans des plaques à 6 puits (puits de 38.5 cm<sup>2</sup>, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) pour tous les types cellulaires décrits ci-haut, de la façon suivante : les cellules à ~ 80% de confluence ont été incubées 5 h en présence de 10 µg de lipofectamine/ml de milieu OPTI-MEM et de 0.2 µg d'ADN de pcDNA3.1-RPR18c, pcDNA3.1-RPR2c ou pcDNA3.1-GHRH-Rβ/10<sup>5</sup> cellules, puis 24 h en présence de 1 ml de milieu enrichi de 20% FBS et 1% pénicilline/streptomycine. Les cellules transfectées ont été sélectionnées en présence 400 µg/ml de généticine (G418) comme agent de sélection, durant 24 à 72 h dans un atmosphère maintenu à 37°C contenant 95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub>. La transfection stable de Zem219b-RPR18c ainsi que la co-transfection stable de Zem219b-RPR18c et pAdVantage (pAdV®) ont été effectuées dans des plaques à 6 puits pour les cellules BHK 570 de la façon suivante: les cellules à ~ 80% de confluence ont été incubées 5 h en présence de 24 µg lipofectamine/ml milieu OPTI MEM et de 0.5 µg d'ADN de Zem219b-RPR18c/10<sup>5</sup> cellules, puis 24 h en présence de 1 ml de milieu enrichi de 20% FBS et 1% d'antibiotiques décrits ci-haut. Les cellules transfectées ont été sélectionnées en présence de 2 µM de méthotrexate, comme agent de sélection, durant 24 à 72 h dans un atmosphère maintenu à 37°C, contenant 95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub>.

La transfection transitoire dans les cellules BHK 570 à ~ 80% de

confluence a été faite en présence de 17  $\mu\text{g}$  de lipofectamine/ml de milieu OPTI-MEM, 10  $\mu\text{g}$  d'ADN pcDNA3.1-RPR18c/ $10^6$  cellules durant 40 h, dans des pétris de  $100\text{cm}^2$ . Les cellules ont ensuite été utilisées immédiatement dans l'essai de liaison avec le radioligand [ $^{125}\text{I}$ -Tyr $^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH $_2$ . La co-transfection transitoire de pcDNA3.1-RPR18c avec pAdV® dans les cellules BHK 570 a été effectuée dans des pétris de  $100\text{ cm}^2$  en présence de CaCl $_2$  (500 mM), et de 13  $\mu\text{g}$  d'ADN de pcDNA3.1-RPR18c/ $10^6$  cellules durant 40 h.

## 2.4 Préparations membranaires

Les préparations membranaires de cellules BHK 570 transfectées, amenées à ~ 80-100% de confluence dans des pétris de  $150\text{ cm}^2$ , ont été lavées 2 fois avec 5 ml de tampon 50 mM Tris-Acétate froid (4°C) (pH 7.4), contenant 5 mM MgCl $_2$ , 5 mM EDTA et 250 mM de sucrose. Les cellules ont été détachées des pétris manuellement à l'aide d'un grattoir à cellules et resuspendues dans un volume final de 15 ml de tampon. Les cellules ont été centrifugées (1000g, 3 min., 4°C, centrifugeuse Beckman) et soniquées sur glace de 1 à 4 fois (2 à 8 sec.) avec un arrêt de 30 sec. entre chaque sonication. Les membranes ont été recueillies par centrifugation (45 000 g, 30 min., 4°C, ultracentrifugeuse Beckman, rotor JA 25.50). Le culot a été resuspendu dans le même tampon Tris-Acétate et soniqué à 4°C au besoin afin d'obtenir une suspension homogène. La concentration protéique était de 2 à 10 mg de protéine/ml, tel que déterminée par la méthode de Bradford (1976), utilisant la BSA comme standard. Les préparations membranaires des cellules BHK 570 transfectées avec



Zem219b-hGHRH-R, pcDNA3.1-RPR18c, pcDNA3.1-RPR2c et pcDNA3.1-GHRH-R $\beta$  ont été congelées à -20°C. Celle des cellules BHK 570 transfectées avec les isoformes Zem219b-RPR18c, Zem219b-RPR2c et Zem219b-GHRH-R $\beta$  ont été congelées à -80°C en présence de 10% de DMSO.

## 2.5 Essai de liaison

Chaque essai a été fait en utilisant 50  $\mu$ l de préparation membranaire (25  $\mu$ g de protéine), 35-50 pM de [ $^{125}$ I-Tyr $^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH $_2$  dans un volume total de 300  $\mu$ l de tampon 50mM Tris-acétate (pH 7.4) contenant 5mM MgCl $_2$ , 5mM EDTA et 0.42% BSA. La liaison non spécifique a été déterminée en présence de 1 ou 0.1  $\mu$ M de rGHRH(1-29)NH $_2$ . L'incubation a été effectuée à 23°C durant 60 min. et arrêtée en transférant 225  $\mu$ l de la solution dans des tubes eppendorf de polyéthylène sur glace, suivi d'une centrifugation (12 000 g, 5 min, 4°C). Pour les études de saturation, neuf concentrations de [ $^{127}$ I-Tyr $^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH $_2$  (0.1 à 1000nM) ont été utilisées. Pour les études de compétition, neuf concentrations (0.1 à 1000 nM) de rGHRH(1-29)NH $_2$ , de hGHRH(1-29)NH $_2$  ou d'analogues Ala- ou D-monosubstitués du hGHRH(1-29)NH $_2$  ont été utilisées.

## 2.6 Localisation immunocytochimique

Afin de s'assurer de la présence de GHRH-R dans les cellules transfectées, les cellules BHK 570 sauvages et transfectées avec pcDNA3.1-RPR18c ou Zem219b-hGHRH-R ont été amenées à ~ 90% de confluence dans des boîtes de culture de 75 cm $^2$ . Les cellules ont été détachées délicatement à

l'aide d'un grattoir et resuspendues dans le milieu de culture. Les cellules ont été centrifugées (1000g, 4 min, 4°C), lavées trois fois dans du tampon 50 mM Tris-Acétate froid (4°C) (pH 7.4), contenant 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA et 50 mM de sucrose et resuspendues à une concentration cellulaire de  $1.0 \times 10^6$  cellules/ml. Les cellules ont ensuite été incubées dans le même tampon à 4°C durant 40 min., cytocentrifugées sur des lames de verre (32 g, 2min, 23°C), à l'aide d'une centrifugeuse Cytospin 3 (Shandon Inc., Pittsburg, PA, USA), fixées dans un tampon 0.1 M phosphate-salin (PBS), contenant 4% de paraformaldéhyde (PFA) (20 min, 23°C), lavées deux fois dans du PBS (2 x 10 min) et incubées 16h (4°C, sous atmosphère humide) avec 10 µg de l'anticorps polyclonal purifié anti-GHRH-R(392-404) (Boulanger et coll., 1999), dans 100 µl de PBS, contenant 1% BSA et 0.05% Triton X-100. Les cellules ont ensuite été lavées dans le PBS (2 x 10 min), incubées 1h, à température ambiante, avec un anticorps secondaire anti IgG de lapin, lié à la fluorescéine (dilution 1:100 dans le tampon PBS-BSA) et soumises à un lavage final dans le PBS (2 x 10 min). L'acquisition des images a été faite dans l'obscurité à l'aide du microscope Nikon Éclipse TE600 (objectif 20X) (Nikon Canada Inc., Montréal, QC, CA), équipé d'une caméra « coolsnap », d'une lampe au mercure à haute pression et de filtres pour l'excitation/émission du fluorochrome Texas-Red (485/520 nm). Toutes les manipulations impliquant le fluorochrome ont été faites dans l'obscurité.

## 2.7 Protection à la RNase

Pour chacun des trois types cellulaires BHK 570, HEK 293 et HeLa, transfectés de façon stable avec pcDNA3.1-RPR18c, trois pétris de 150 cm<sup>2</sup> à ~80% de confluence étaient requis (0.8-1mg d'ARN total/20X10<sup>6</sup> cellules/pétri). L'ARN total a été isolé avec du TRIzol, ajouté directement dans les pétris sur glace (4 ml/pétri). La sonde antisens RPR64 marquée au <sup>32</sup>P, correspondant à l'extrémité 3' de l'ADNc du GHRH-R (nucléotides 1044-1611), a été générée par transcription *in vitro* du plasmide RPR64-pGEM3z linéarisé par l'enzyme *Bam*HI, utilisant la *T7* ARN polymérase (trousse de transcription MAXIscrip), en présence d' $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]UTP (800 Ci/mmol). Le niveau d'ARNm de GAPDH a été déterminé dans chaque échantillon en utilisant une sonde dérivée des exons 5-8 de l'ADNc de rat de GAPDH (nucléotides 369-685). Cette sonde antisense a été générée par transcription *in vitro* du plasmide p-TRI-GAPDH linéarisé avec l'enzyme *Xba*I, utilisant la *T7* RNA polymérase. L'activité spécifique de la sonde [<sup>32</sup>P]RPR64, déterminée après précipitation à l'acide trichloroacétique sur des filtres Whatman GF/B était de 732 X 10<sup>6</sup> cpm/ $\mu$ g d'ARN et le pourcentage d'incorporation de  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]UTP était de 68%. L'essai de RPA a été effectué selon Boisvert et coll. (2002) à l'aide de la trousse RPA II. Cinq  $\mu$ g d'ARN total de tous les types cellulaires transfectées avec pcDNA3.1-RPR18c ont été hybridés 16h à 50°C avec 4X10<sup>6</sup> cpm/ml de la sonde [<sup>32</sup>P]RPR64. Les niveaux d'ARNm du GHRH-R ont été normalisés en ajoutant un standard externe (40 pg du fragment *Msc* I de l'ADNc de RPR64, correspondant aux nucléotides 1044-1203 de l'ADNc de RPR64) aux échantillons d'ARN total avant hybridation. Une seconde étape de normalisation a été effectuée avec GAPDH comme standard interne,

permettant de maintenir le coefficient de variation intra-essai  $\leq 10\%$ . Les acides nucléiques non liés ont été digérés à la *RNase A* (1 U/ml) et *T* (40 U/ml) à 37°C durant 30 min. Les hybrides stables ont été séparés sur gel dénaturant de 5% polyacrylamide-8 M urée de 1.5 mm. Les autoradiogrammes ont été générés à -80°C sur film Biomax Ms-1 en utilisant un écran intensificateur. L'intensité des bandes a été mesurée à l'aide du système IS1000 Digital imaging (Alpha Innotech Corp/Canberra Packard, Concord, ONT, CA).

## 2.8 Buvarpage Northern

Pour les cellules BHK 570 transfectées de façon stable avec Zem219b-hGHRH-R et Zem219b-RPR18c, trois pétris de 150 cm<sup>2</sup> à ~ 80% de confluence étaient requis (0.8-1mg d'ARNm total/20X10<sup>6</sup> cellules/pétri). L'ARN total des cellules a été isolé avec du TRIzol, ajouté directement dans les pétris sur glace (4 ml/pétri). L'hybridation a été faite tel que décrit précédemment (Girard et coll., 1999). Des échantillons de 12 µg d'ARNm total ont été soumis à une dénaturation à 65°C pendant 10 min. dans une solution 50% formamide/17.5% formaldéhyde/15 mM MOPS et à une séparation par électrophorèse sur gel 1.2% agarose/17.5% formaldéhyde, en utilisant un tampon 33 mM MOPS, pH 7.0, contenant 5 mM d'acétate de sodium et 1 mM d'EDTA (pH 8.0). L'ARN a été transféré du gel sur une membrane de nylon par capillarité et lié à celle-ci de façon covalente par exposition aux UV et incubation à 80°C pendant 2h. L'hybridation a été faite avec la sonde RPR64, marquée avec du [<sup>32</sup>P]deoxy-CTP (3000 Ci/mmol), à l'aide d'amorces hexamériques aléatoires et le fragment de

Klenow de l'ADN polymérase de *E. Coli*. Elle a été purifiée par chromatographie sur une colonne G-50. Les membranes ont été préhybridées dans la solution de Robbins, préchauffées à 65°C durant 2 h (7% SDS, 0.25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7.4), 1mM EDTA (pH 8.0), 10 g/L BSA). La sonde radioactive RPR64, préalablement bouillie 4 min. (bain sec à 100°C) et refroidie sur la glace durant 2 min., a été diluée dans la solution de Robbins (5-10X10<sup>6</sup> cpm/ml). L'hybridation a été faite durant 16 h à 65°C. Les membranes ont été par la suite lavées dans du tampon 2X *standard saline citrate* (SSC) (1X SSC: 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0)/0.1% SDS à 23°C (2 fois, 10 min.); 1X SSC/0.1% SDS, 65°C (1-2 fois, 10 min.) ; 0.5X SSC/0.1% SDS, 65°C (1-2 fois, 10 min.) Les autoradiogrammes ont été générés sur film Bio Max MS-1 à -80°C en utilisant un écran intensificateur. La sonde RPR64 hybridée a été éluée en incubant les membranes 1 h dans une solution bouillante de 0.1% SDS (dans de l'eau picopure) avec agitation sur plaque. Une normalisation des intensités des transcrits d'ARNm du GHRH a été effectuée en utilisant une sonde d'ARN ribosomal 28S de rat comme standard interne, permettant de maintenir le coefficient de variation intra-essai  $\leq 10\%$ . La quantification de chaque bande d'ARNm a été effectuée à l'aide du système IS1000 Digital Imaging. La spécificité de l'hybridation de la sonde [<sup>32</sup>P]RPR64 a été évaluée en utilisant 12 µg d'ARN total de foie comme témoin négatif.

## 2.8 Études d'internalisation avec le ligand [N<sup>α</sup>-5carboxyfluoresceinyl-D-Ala<sup>2</sup>, Ala<sup>8</sup>, Ala<sup>15</sup>, Lys<sup>22</sup>]hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>.

Toutes les étapes du protocole ont été réalisées à 4°C afin de prévenir l'internalisation du récepteur du GHRH-R (Sarret et coll., 1999), sauf pour les incubations à 37°C. La préparation des cellules BHK 570 sauvages et transfectées avec Zem219b-hGHRH-R ou avec Zem219b-RPR18c a été effectuée tel que décrite à la section localisation immunocytochimique. Les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c ont été carencées en sérum 4 h avant leur prélèvement. Les cellules ont été centrifugées (800g, 5 min.), lavées 3 fois dans du tampon 50 mM Tris-acétate froid (4°C) (pH 7.4) contenant 5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM EDTA et 50 mM de sucrose (tampon Tris-acétate-sucrose) et resuspendues dans ce tampon afin d'obtenir une concentration cellulaire de 0.5-0.8 x 10<sup>6</sup> cellules/ml. La fillipine III, un inhibiteur de l'internalisation par les cavéoles, a été solubilisée dans 100% DMSO et dilué dans le tampon Tris-acétate pour avoir une concentration finale de 0.1% DMSO à 16 nM de fillipine. Le volume d'incubation final avec le ligand Fluo-GHRH était de 200 µl/tube d'essai dans toutes les expériences. Les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-hGHRH-R ont été incubées à 4°C pendant 40 min. en présence de 1nM Fluo-GHRH alors que les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c ont été incubées avec 10 nM du ligand Fluo-GHRH. Après centrifugation (4000g, 5 min., 4°C), les cellules ont été lavées une fois dans le tampon Tris-acétate-sucrose, resuspendues dans celui-ci et cytocentrifugées pour visualisation immédiate, ou incubées à 37°C durant 30, 60,

90 ou 120 min., afin de permettre l'internalisation du Fluo-GHRH. Les effets de 16 nM de fillipine III (Okamoto et al., 2000; Lobie et al., 1999) sur l'internalisation du Fluo-GHRH à 37°C ont été étudiés en préincubant les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c 10 min. avec l'inhibiteur (volume total de 190 µl/tube à essai) préalablement à l'addition de Fluo-GHRH. Les incubations subséquentes à 4°C (40 min.) et 37°C (60 min.) avec le Fluo-GHRH ont été faites en présence de l'inhibiteur. Des expériences d'internalisation ont également été menées en présence de 450 mM de sucrose, inhibiteur de l'endocytose par la voie des clathrines (Heuser et al., 1989; Oksche et al., 2000), utilisant le temps d'incubation décrit pour la fillipine III. La liaison spécifique a été déterminée en présence de 1 µM de rGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>. Les réactions d'internalisation ont été arrêtées en plaçant les cellules à 4°C et par cyto centrifugation. Les lamelles ont subséquemment été conservées sur la glace, pour observation immédiate par microscopie à fluorescence. Toutes les étapes impliquant le Fluo-GHRH ont été faites dans l'obscurité.

## **2.10 Analyse des données et statistiques**

Le programme Ligand a été utilisé pour analyser les courbes de compétition et de saturation (Munson et coll., 1980). La stratégie utilisée pour estimer les paramètres de liaison ( $K_d$ , constante de dissociation à l'équilibre apparente;  $B_{max}$ , capacité maximale de liaison;  $IC_{50}$ , concentration des analogues de hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> inhibant 50% de la liaison spécifique du radioligand [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>10</sup>]hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub>) a été décrite précédemment (Atribat et coll., 1990).

Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SE. La signification des différences entre les données a été évaluée à l'aide du test de *t* de *Student* à deux voies non pairé et a été établie à  $p < 0.05$ .

En ce qui concerne l'imagerie cellulaire, les acquisitions d'images en fluorescence ont été effectuées à partir de 50-60 cellules représentatives (en duplicata) à partir de trois expériences indépendantes pour chaque condition. Le traitement des données a été effectué à l'aide du logiciel MetaMorph 4.6 (Universal Imaging Corporation, Canberra Packard Canada, LTD, Mississauga, ONT, CA). Six intensités correspondant à une échelle de six codes de couleur ont été utilisées pour analyser les signaux en fluorescence (bruit de fond=0 (0-43 pixels), très faible=1 (44-85 pixels), faible=2 (86-128 pixels), modérée=3 (129-170 pixels), élevée=4 (171-213 pixels) et très élevée=5 (214-255 pixels)). La fluorescence totale, pour chaque image, a été exprimée en unités arbitraires et définie selon  $\sum$  (% cellules X niveau d'intensité du code de fluorescence (0, 1, 2, 3, 4 or 5)). Les résultats ont été exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SEM. Les effets du temps et des conditions d'incubation sur l'intensité de fluorescence et sa distribution ont été analysés par ANOVA suivi du test de *Dunnnett*. Les effets des inhibiteurs ont été évalués à l'aide du test de *t* de *Student*. La significativité statistique a été établie à  $p < 0.05$ .

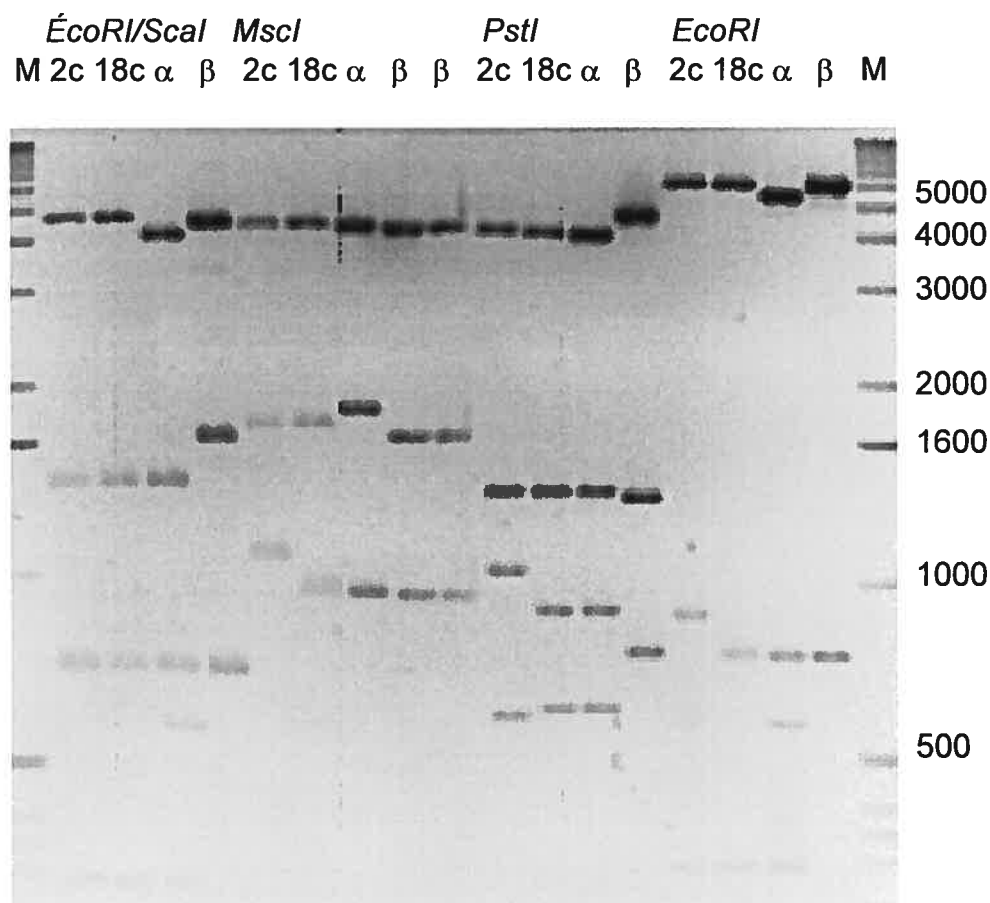


### **3. RÉSULTATS**

#### 4.1. Système d'expression

Le plasmide d'expression pcDNA3.1 a d'abord été sélectionné puisqu'il contient un promoteur CMV permettant un haut niveau d'expression dans les cellules de mammifère, telles que les cellules BHK utilisées, un gène de résistance à la généticine pour la sélection des transfectants, un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection des transformants, une origine de réplication ColE1 nécessaire lors de la transcription du plasmide chez *Escherichia coli* et une origine de réplication SV40, utilisée pour la réplication du plasmide dans les cellules de mammifères. Ainsi, les constructions pcDNA3.1-RPR18c, pcDNA3.1-RPR2c et pcDNA3.1-GHRH-R $\beta$  ont été caractérisées par analyse de restriction. Tel que présenté à la Fig. 3, les bandes obtenues suite aux digestions enzymatiques des constructions sont celles attendues. Les bandes à considérer sur le gel sont celles qui renferment la séquence formant la troisième boucle intracytoplasmique du GHRH-R où se situe l'insertion de 123 pb (présente dans pcDNA3.1-RPR2c seulement), entre les standards de poids moléculaires de 2 kb et 500 pb. Cette insertion permet de différencier les ADNc. Mentionnons entre autre les troisièmes bandes à partir du haut du gel des digestions *MscI* (1089 et 966 pb) et *PstI* (1041 et 918 pb) ainsi que les deuxièmes bandes de la digestion *EcoRI* (901 et 778 pb) pour les plasmides pcDNA3.1-RPR2c et pcDNA3.1-RPR18c, respectivement, toutes distantes de 123 pb. PcDNA3.1-RPR2c possède donc l'insertion de 123 pb. De plus, les digestions *MscI* (1089 et 966 pb) et *EcoRI* (901 et 778 pb) (troisième bande à partir du haut du gel) présentent également une différence de 123 pb pour les

**Fig. 3 :** Analyse de restriction des constructions pcDNA3.1-RPR18c (18c), pcDNA3.1-RPR2c (2c), pcDNA3.1-GHRH-R $\alpha$  ( $\alpha$ ) et pcDNA3.1-GHRH-R $\beta$  ( $\beta$ ).

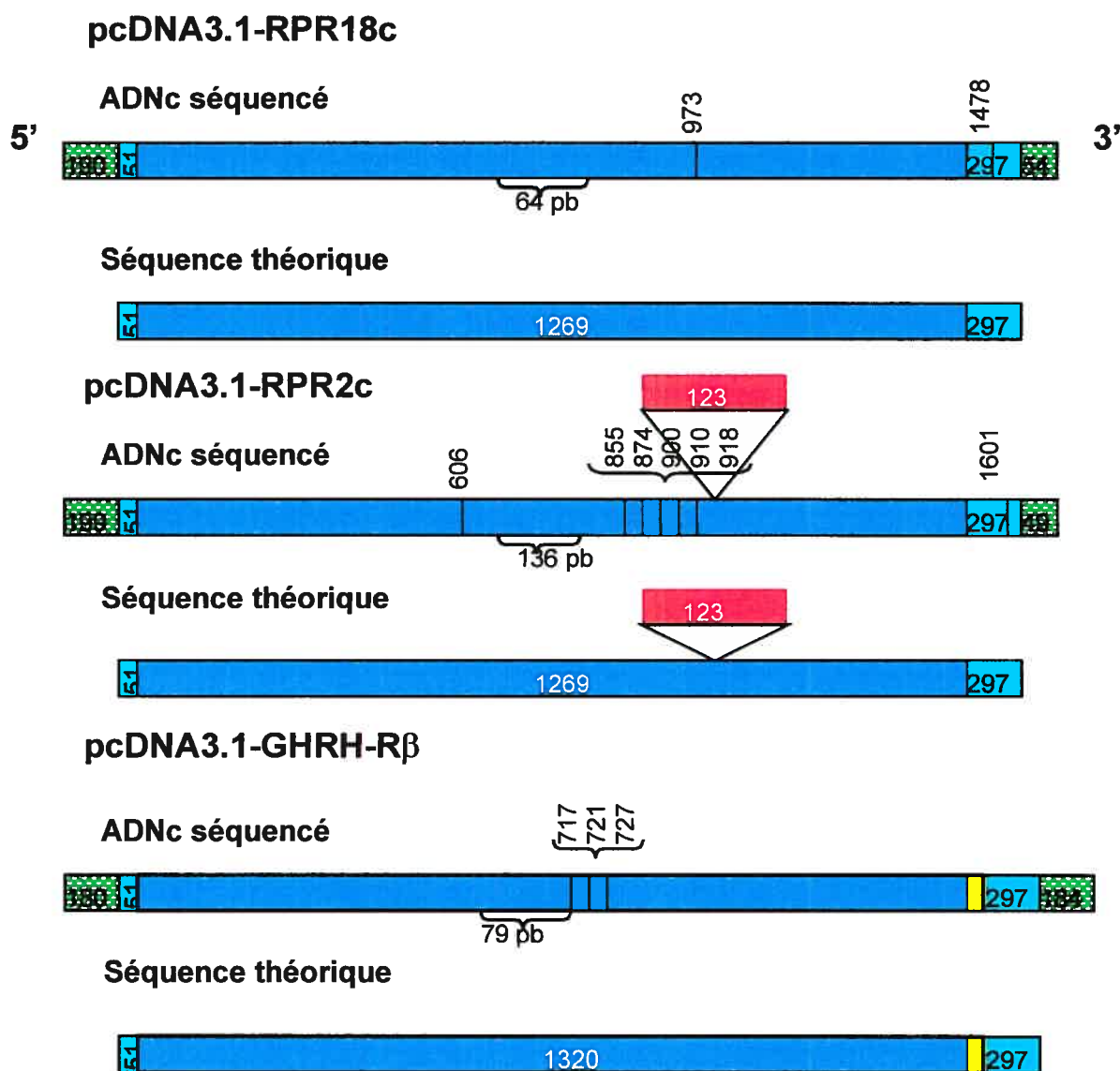


Séparation des produits de digestion des quatre plasmides construits par électrophorèse sur gel d'agarose 1.2%, digérés avec les enzymes de restriction *EcoRI*, *Scal*, *MscI* et *PstI* et révélation à l'aide du bromure d'éthidium. Les standards de poids moléculaires (M) figurent aux extrémités du gel. La construction pcDNA3.1-GHRH-R $\alpha$  n'est pas considérée dans ce mémoire étant donné que sa structure s'est avérée être la même que celle de pcDNA3.1-RPR18c. Ce gel est représentatif de deux expériences indépendantes.


plasmides pcDNA3.1-RPR2c et pcDNA3.1-GHRH-R $\beta$  (sans l'insertion) respectivement. PcDNA3.1-GHRH-R $\beta$  ne posséderait donc pas l'insertion de 123 pb, contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature (Zeitler et coll., 1998).

Les trois constructions ont également été séquencées (Fig. 4). Une amorce de 21 nucléotides s'appariant à une séquence du promoteur CMV du vecteur pcDNA3.1 située dans une fenêtre de 180 à 199 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription (selon la construction), et une autre amorce de 18 nucléotides s'appariant à une séquence de la queue de polyadénylation (BGH) du vecteur située dans une fenêtre de 49 à 184 nucléotides en aval du site de terminaison de la transcription (selon la construction), ont été utilisées pour le séquençage. Les amorces choisies ont permis de connaître avec exactitude, en ayant une partie de la séquence du promoteur et de la queue de polyadénylation, la séquence de l'ADNc du récepteur natif et de ses isoformes. Les pourcentages d'homologie des domaines 5' et 3' des ADNc du récepteur natif et de chaque isoforme, comparés avec leur séquence théorique tel que retrouvée dans la banque de données GenBank sont les suivants : 98 et 96% pour RPR18c, 97 et 98% pour RPR2c et 98 et 99% pour GHRH-R $\beta$ . Deux pourcentages d'homologie sont rapportés pour chaque ADNc étant donné qu'un domaine de 64 à 136 pb situé à la partie centrale de chaque ADNc n'a pu être séquencé. Des différences sont présentes entre les trois ADNc : présence ou absence de l'insertion de 123 pb dans la troisième boucle intracytoplasmique

**Fig. 4.** Représentation schématique des résultats de séquençage des trois constructions pcDNA3.1-RPR18c, pcDNA3.1-RPR2c et pcDNA3.1-GHRH-R $\beta$ .



| : erreurs de séquence dues à la technique (position identifiée ci-dessus)

 : segments séquencés du plasmide (promoteur et queue de polyadénylation)

 : séquence codante modifiée en C-terminal de l'ADNc GHRH-R $\beta$

 : insertion de 123 pb dans la 3<sup>ème</sup> boucle intracytoplasmique

 : séquence codantes des ADNc  : séquences non codantes des ADNc

(Fig. 4; segment rouge) ainsi que la modification de la séquence codant pour le domaine C-terminal (Fig. 4; segment jaune). La structure de l'ADNc de RPR18c rapportée dans GenBank comporte 1629 pb dont 297 font partie de la séquence non codante du segment 3' et dont 51 pb précède le codon d'initiation de la transcription (Fig 4; segments bleu pâle). Il en est de même pour pcDNA3.1-RPR2c et pcDNA3.1-GHRH-R $\beta$  avec cependant une addition de 123 pb dans la troisième boucle intracytoplasmique et de 51 pb en C-terminal, respectivement. Les erreurs de séquençage, soit de bases manquantes obtenues aux positions 1478 de l'ADNc RPR18c et 1601 de l'ADNc RPR2c (Fig. 4; traits noirs), faisaient partie des séquences non codantes des ADNc, ayant ainsi aucun impact sur la structure du GHRH-R. De plus, les erreurs de séquençage, soit les bases manquantes aux positions 973 de l'ADNc RPR18c, aux positions 606, 855, 874, 900, 910 et 918 de l'ADNc RPR2c et aux positions 717, 721 et 727 de l'ADNc GHRH-R $\beta$  sont attribuables aux limites de la technique de séquençage pourraient être causées par une concentration trop faible de dNTP dans la réaction.

### 3.2 Conditions d'expression

La qualité des constructions ayant été confirmée, chacune d'elle a été transfectée de façon stable dans la lignée cellulaire eucaryote BHK 570. L'essai de liaison avec le radioligand [ $^{125}$ I-Tyr $^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH $_2$  ( $^{125}$ I-GHRH) a été retenu comme moyen rapide et efficace de déterminer la présence de récepteurs fonctionnels du GHRH. Deux paramètres importants ont été considérés dans

l'essai de liaison: le pourcentage de liaison spécifique, indicatif de la fonctionnalité des récepteurs exprimés et le pourcentage B/T (Bound/Total; Bound : radioactivité spécifiquement liée, Total : radioactivité totale), représentatif de la concentration apparente de récepteur dans les préparations membranaires. La lignée cellulaire BHK 570 a été choisie puisqu'elle a été utilisée pour la transfection et la caractérisation du hGHRH-R, permettant ainsi une comparaison ultérieure des profils pharmacologiques des deux récepteurs. La transfection stable a été choisie puisqu'elle favorise une uniformisation des niveaux d'expression des récepteurs, comparativement à la transfection transitoire, minimisant ainsi les variations inter essai des essais de liaison, ce qui s'avère important dans le cadre d'une étude de structure-affinité. Tel que présenté au tableau 1, le taux de liaison spécifique et le pourcentage B/T pour le hGHRH-R (témoin positif) étaient de 88% et de 14.2%, respectivement alors que ceux des transfections stables pour les trois constructions étaient faibles ou nuls. pcDNA3.1-RPR18c a alors été transfecté de façon stable dans deux autres lignées eucaryotes : les cellules épithéliales humaines d'adénocarcinome du col de l'utérus (HeLa) et des cellules épithéliales humaines de rein (*human embryonic kidney cells*; HEK 293). Tel que présenté au tableau 1, les taux de liaison spécifique étaient également nuls pour les transfections dans ces lignées cellulaires. Suite à ces résultats négatifs des transfections stables, une condition témoin a été étudiée, soit une transfection transitoire avec pcDNA3.1-RPR18c dans les cellules BHK 570. L'essai de liaison a été effectué 40 h après la transfection, afin d'augmenter de façon importante la concentration de récepteur

**Tableau 1.** Résultats de mise au point des conditions d'expression du GHRH-R.

Type de transfection	ADNc/Lignée cellulaire	Liaison spécifique (%)	B/T (%)
Stable	hGHRH-R/BHK 570	$88 \pm 2$	$14.8 \pm 1.5$
Stable	RPR18c/BHK 570	0	0
Stable	RPR2c/BHK 570	0	0
Stable	GHRH-R $\beta$ /BHK 570	$13 \pm 1$	$0.8 \pm 0.1$
Stable	RPR18c/HeLa	0	0
Stable	RPR18c/HEK 293	0	0

Chaque expérience a été réalisée trois fois en triplicata. Tous les ADNc étaient insérés dans le plasmide d'expression pcDNA3.1, sauf celui du hGHRH-R, qui était inséré dans le plasmide d'expression Zem219b.

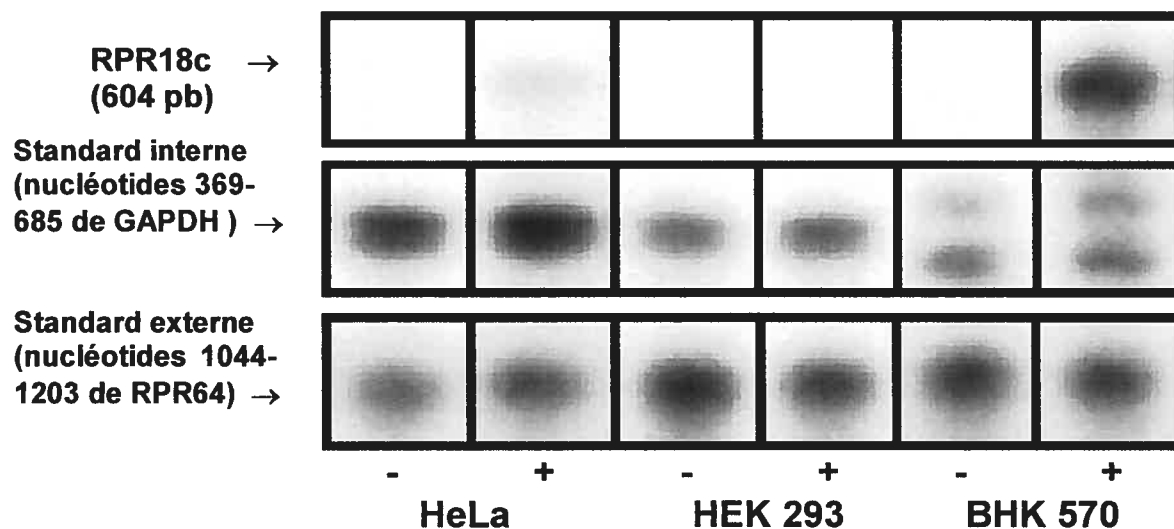


produit par la cellule. Le taux de liaison spécifique dans cette condition était également nul.

Considérant l'ensemble de ces résultats négatifs, les mises au point subséquentes des conditions d'expression du rGHRH-R et de ses isoformes ont été effectuées avec RPR18c uniquement. Afin de s'assurer qu'il y avait transcription de l'ADNc du récepteur natif de 423 aa, transfecté dans les lignées BHK 570, HeLa et HEK 293, une étude qualitative de protection à la RNase (RPA) a été effectuée. La Fig. 5 indique la présence d'une bande intense dans les cellules BHK 570 transfectées, signifiant qu'il y a transcription dans ce système. Par contre, la présence d'une très faible bande dans les cellules HEK 293 et l'absence de signal dans les cellules HeLa indique une inefficacité de la transfection stable dans ces types cellulaires, dans les mêmes conditions.

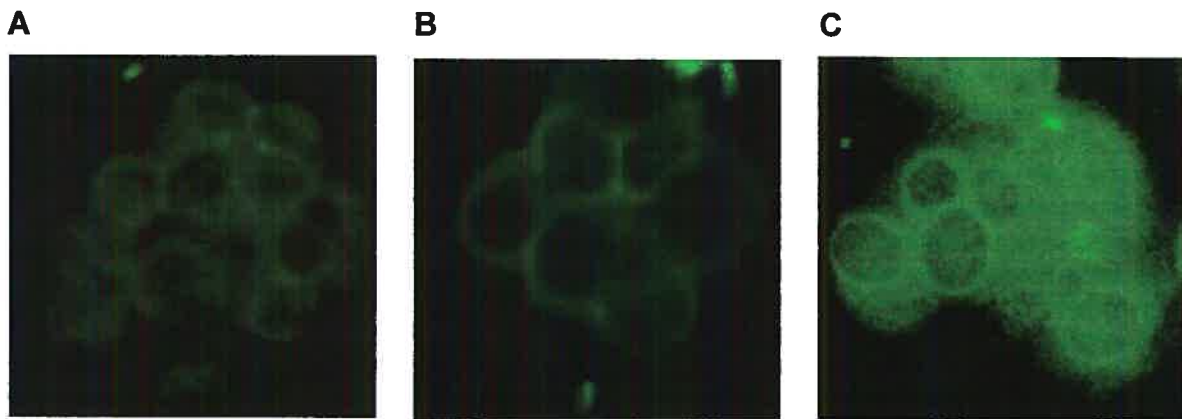
Ayant démontré que l'ADNc RPR18c du rGHRH-R est transcrit efficacement dans les cellules BHK 570, une évaluation immunocytochimique à l'aide de l'anticorps anti-GHRH-R(392-404), reconnaissant l'extrémité C-terminale du r et hGHRH-R, a été effectuée dans les cellules BHK 570 transfectées avec la construction pcDNA3.1-RPR18c. Cette étude qualitative avait pour objectif de vérifier la présence du rGHRH-R natif exporté à la membrane plasmique. Tel que présenté à la Fig. 6, les cellules BHK 570 transfectées avec pcDNA3.1-RPR18c présentent une intensité de fluorescence similaire au témoin négatif (cellules BHK 570 sauvages), et beaucoup plus faible

**Fig. 5.** Représentation autoradiographique d'une analyse par essai de protection à la RNase des niveaux de transcrit d'ARNm du GHRH-R dans les cellules BHK 570, HeLa et HEK 293 sauvages (-) et transfectées de façon stable (+) avec pcDNA3.1-RPR18c.



Cinq  $\mu$ g d'ARNm total ont été analysés pour chaque type cellulaire transfecté ou non. Cet autoradiogramme est représentatif d'une expérience indépendante exécutée en duplicata.

**Fig. 6.** Visualisation par immunofluorescence du GHRH-R dans les cellules BHK 570 transfectées de façon stable avec pcDNA3.1-RPR18c (A), sauvages (B) et transfectées avec hGHRH-R (C).



Les cellules ont été incubées à 4°C pendant 16 hs en présence de 10  $\mu$ g d'anticorps primaire anti-GHRH-R(392-404) dirigé contre la portion C-terminale du récepteur et 1 h en présence d'un anticorps secondaire anti IgG de lapin couplé à la fluorescéine. Ces images sont représentatives de trois expériences indépendantes. Le temps d'exposition était de 2 sec.

que le témoin positif (cellules BHK 570 transfectées avec le hGHRH-R). Ceci suggère une inefficacité de la traduction de l'ARNm en protéine mature.

De nouvelles conditions de transfection ont donc été développées dans le but d'améliorer le niveau de traduction. Premièrement, une co-transfection transitoire des cellules BHK 570 avec pcDNA3.1-RPR18c et un vecteur commercial, le pAdV® a été évaluée. Un phénomène observé lors d'une transfection stable ou transitoire est l'inhibition du facteur de traduction *eukaryotic initiation factor-2* (eIF-2), engendrée par sa phosphorylation qui est dépendante de la *double RNA-activated inhibitor* (DAI). Le vecteur pAdV® agit en produisant un ARNm, le *adenovirus associated 1 RNA* (VAI) qui se lie à la DAI empêchant ainsi la phosphorylation de eIF-2 (Grokreutz et coll., 1994; Kitajewski et coll., 1986; O'Malley et coll., 1986; Farrell et coll., 1977). Deuxièmement, une carence en sérum de 4 h des cellules BHK 570, transfectées de façon stable avec pcDNA3.1-RPR18c, avant leur prélèvement pour l'essai de liaison, a été étudiée. Cette manipulation élimine les facteurs de croissance contenus dans le sérum, ayant pour effet d'activer la transcription de pcDNA3.1-RPR18c par la voie des facteurs nucléaires NF $\kappa$ B (*nuclear factor kappa B*) et CREB (*AMPC-response element binding protein*), qui, en augmentant la concentration d'ARNm dans la cellule, activent la kinase DAI (Pap et coll., 2002; Kleinj et coll., 2000). Tel que présenté au tableau 2, les pourcentages de liaison spécifique du  $^{125}$ I-GHRH dans les préparations membranaires des cellules transfectées avec chaque stratégie indiquent

**Tableau 2.** Mise au point des conditions d'expression du GHRH-R.

Condition d'expression	Système d'expression	Nb. d'exp.	Liaison spécifique (%)	B/T (%)
Stable	Zem219b-hGHRH-R	6	$77 \pm 10$	$17.6 \pm 6.2$
Co-transitoire	pcDNA3.1-RPR18c/pAdV	4	$62 \pm 4$	$11.2 \pm 3.4$
Stable/carence en sérum de 4h	pcDNA3.1-RPR18c	2	$53 \pm 1$	$8.6 \pm 1.2$

Chaque expérience indépendante a été effectuée en triplicata.

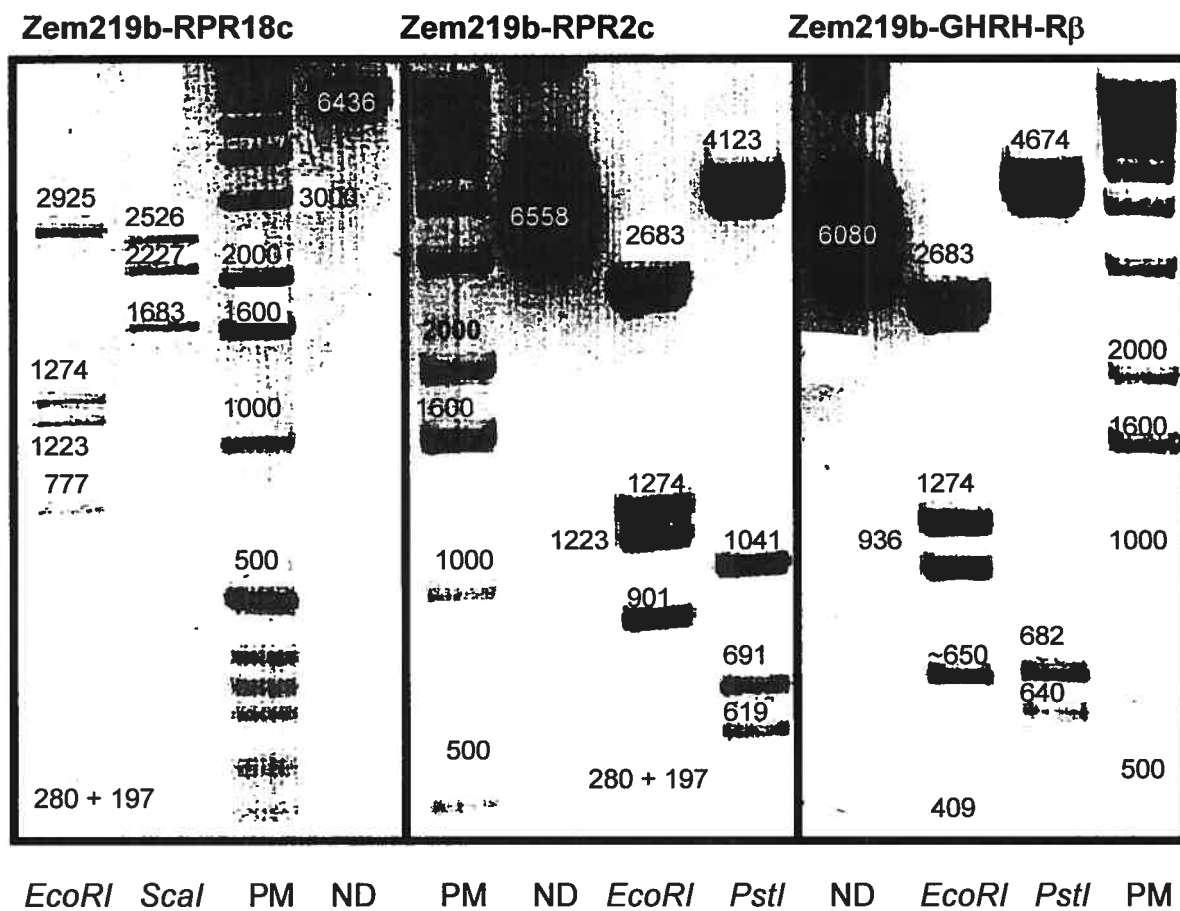
qu'elles permettent d'améliorer les conditions d'expression du rGHRH-R. Les pourcentages de liaison spécifique ( $62 \pm 4\%$  pour la cotransfection avec pAdV® et  $53 \pm 1\%$  pour la carence en sérum de 4 h) ainsi que les pourcentages B/T ( $11.2 \pm 3.4\%$  et  $8.6 \pm 1.2\%$ , respectivement) n'étaient pas significativement différents entre eux selon le test de *t* de *Student* ( $p > 0.05$ ) pour les deux stratégies mais le sont en comparaison aux résultats négatifs précédents (tableau 1). Comparativement au témoin positif, les taux de liaison spécifique des deux conditions d'expression sont significativement différents. Ils sont de 1.2 et 1.5 fois plus faibles pour les conditions de la cotransfection de pcDNA3.1-RPR18c avec pAdV® et de la carence en sérum de 4 h, respectivement par rapport à celle du témoin positif. Les faibles différences indiquent cependant la validité de ces stratégies.

Le plasmide d'expression Zem219b, comportant un promoteur inductible par le zinc a également été évalué. Celui-ci avait été utilisé pour l'expression du hGHRH-R dans les cellules BHK 570. Cette condition d'expression n'avait pas été testée pour le récepteur du GHRH natif et ses isoformes dans un premier temps puisque le plasmide pcDNA3.1, choisi pour son promoteur CMV favorisant une forte expression dans les cellules eucaryotes et dans lequel l'ADNc GHRH-R $\beta$  était déjà inséré, semblait un système d'intérêt. Le plasmide d'expression Zem219b a été choisi puisqu'il permet un contrôle de la concentration d'ARNm du rGHRH-R dans la cellule par le zinc. Rappelons ici qu'une forte concentration d'ARNm dans la cellule constitue un facteur favorisant l'activation de la DAI et,

par le fait même, l'inhibition du facteur de traduction eIF-2 (Chang et coll., 2002). Les ADNc RPR18c, RPR2c et GHRH-R $\beta$  ont été clonés dans ce plasmide d'expression puis caractérisés par analyse de restriction. Tel que présenté à la Fig. 7, les bandes attendues de 2925, 1274, 1223 et 777 pb pour Zem219b-RPR18c, de 2683, 1274, 1223 et 901 pb pour Zem219b-RPR2c et de 2683, 1274, 936, 778 et 409 pb pour Zem219b-GHRH-R $\beta$ , suite à une digestion par *EcoRI* sont présentes. De plus, les bandes attendues de 2526, 2227 et 1683 pb pour Zem219b-RPR18c suite à une digestion par *ScaI*, de 4123, 1041, 691 et 619 pb pour Zem219b-RPR2c et de 4674, 682 et 640 pb pour Zem219b-GHRH-R $\beta$  suite à une digestion par *PstI* sont également présentes. Ces digestions ont permis de valider la qualité des trois constructions. La mise au point des conditions d'expression du GHRH-R ont été poursuivies avec Zem219b-RPR18c.

La construction Zem219b-RPR18c a donc été transfectée de façon stable dans les cellules BHK 570. Une étude par buvardage Northern effectuée à partir de l'ARNm total des cellules BHK 570 transfectées ainsi que sur deux témoins (cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-hGHRH-R, cellules BHK 570 sauvages) a permis de vérifier s'il y avait transcription de l'ADNc transfecté en ARNm du rGHRH-R. Le niveau du transcrit de 2.5 kb est présenté à la Fig. 8. Après normalisation avec l'ARNr 28S, les résultats indiquent que les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c renferment un niveau d'ARNm du GHRH-R 1.5 fois supérieur à ceux des cellules transfectées avec Zem219b-hGHRH-R. Le niveau d'ARNm de RPR18c a donc été jugé suffisant.

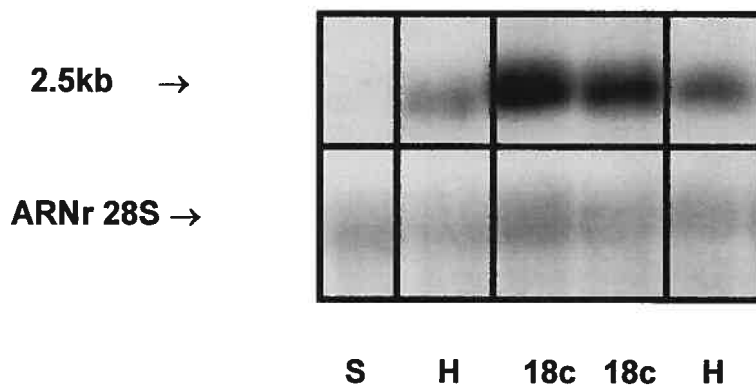
**Fig. 7.** Analyse de restriction des constructions Zem219b-RPR18c, Zem219b-RPR2c et Zem219b-GHRH-R $\beta$ .



Séparation des produits de digestions des trois plasmides construits par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%; révélation à l'aide du bromure d'éthidium; digestion avec les enzymes de restriction *EcoR1*, *Sca1* et *Pst1*. Les standards de poids moléculaires sont désignés par PM et les constructions non digérées, par ND. Ce gel est représentatif de trois expériences indépendantes.



**Fig. 8.** Représentation autoradiographique d'un buvardage Northern montrant les niveaux de transcrits de 2.5 kb d'ARNm du GHRH-R dans les cellules BHK 570 sauvages (S) et transfectées de façon stable avec Zem219b-RPR18c (18c) ou Zem219b-hGHRH-R (H-témoin positif)



Douze  $\mu$ g d'ARNm total ont été analysés pour tous les échantillons. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

### 3.3 Validation des conditions d'expression du rGHRH-R natif

Les différentes conditions d'expression du rGHRH-R RPR18c préétablies ont été validées par essai de liaison afin de vérifier la fonctionnalité du récepteur obtenu. Les paramètres utilisés indiquant la présence d'un récepteur fonctionnel sont l'affinité du GHRH pour son récepteur ( $K_d$ ,  $IC_{50}$ ). De plus, la concentration maximale apparente de GHRH-R ( $B_{max}$ , B/T) a été considérée pour évaluer le niveau d'expression. Tous les essais de liaison ont été effectués dans des préparations membranaires. Deux conditions témoins ont été utilisées, à des fins de comparaison, pour valider les conditions d'expression de Zem219b-RPR18c, à savoir l'utilisation de cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c (témoin négatif) ou avec Zem219b-hGHRH-R (témoin positif) n'ayant pas subi de carence en sérum. Tel que présenté au tableau 3, la carence en sérum a eu un effet significatif sur le taux de liaison spécifique, étant 1.5 fois supérieur à celui du témoin négatif ( $p < 0.05$ ) et non différent de celui du témoin positif. Le  $K_d$  et la concentration apparente de GHRH-R ( $B_{max}$ ) étaient non significativement différents du témoin positif alors que le B/T était de 2.4 à 2.8 fois supérieur à celui du témoin négatif, suggérant l'importance de l'emploi de la carence de 4h en sérum. Lorsque la co-transfection de Zem219b-RPR18c avec pAdV® a été utilisée en association avec une carence en sérum de 4 h, le taux de liaison spécifique était de 1.8 fois supérieur à celui du témoin négatif ( $p < 0.05$ ) et non significativement différent de celui du témoin positif. Le  $K_d$  était non significativement différent du témoin positif et la concentration apparente de récepteur apparente de GHRH-R ( $B_{max}$ ) était de 1.5 ( $p < 0.05$ ) et (B/T) 4.3 ( $p <$

**Tableau 3.** Comparaison des paramètres de liaison du GHRH dans les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c, co-transfectées avec Zem219b-RPR18c et le vecteur pAdVantage® ou transfectées avec Zem219b-hGHRH-R.

Condition d'expression	Système d'expression	Nb. d'exp.	Liaison spécifique (%)	IC <sub>50</sub> (nM)	K <sub>d</sub> (nM)	B <sub>max</sub> (pmol/mg de prot.)	B/T (%)
Carence en sérum de 4hs	Zem219b-RPR18c	3	60 ± 4	2.00 ± 0.77			9.9 ± 2.1
	Zem219b-RPR18c	2	64 ± 1		0.84 ± 0.59	1.05 ± 0.51	11.7 ± 1.6
Carence en sérum de 4hs	Zem219b-RPR18c/pAdV®	3	74 ± 4	2.79 ± 0.50			17.5 ± 1.9
	Zem219b-RPR18c/pAdV®	4	73 ± 4		1.06 ± 0.11	1.88 ± 0.14	17.3 ± 1.5
Témoin, sans carence en sérum	Zem219b-RPR18c	3	40 ± 10	0.4 ± 0.3			4.1 ± 1.9
	Zem219b-hGHRH-R	2	77 ± 3		0.79 ± 0.21	1.24 ± 0.13	15.3 ± 0.9

La valeur d'IC<sub>50</sub> est la concentration de ligand rGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> inhibant 50% de la liaison spécifique du radioligand [<sup>125</sup>I]-Tyr<sup>10</sup>hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub>. Le B<sub>max</sub> et le B/T représentent la concentration apparente de récepteur dans la préparation membranaire utilisée. Le K<sub>d</sub> est représentatif de l'affinité du radioligand pour le récepteur natif RPR18c. Chaque expérience indépendante a été effectuée en triplicata.

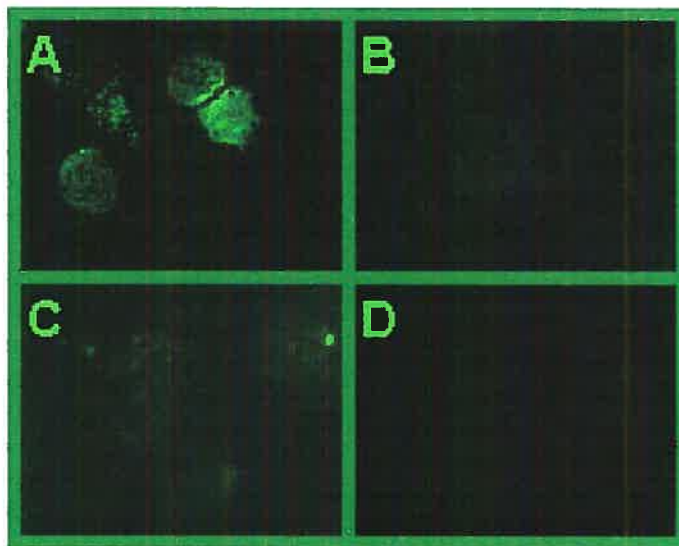
0.05) fois supérieure à celles du témoin positif et négatif, respectivement, validant cette condition d'expression. Mentionnons enfin que des conditions de congélation à long terme des préparations membranaires ont été mises au point : une congélation à 5-10 mg de protéine/ml de tampon Tris-Acétate, dans 10 % DMSO à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Afin de vérifier la présence à la membrane cytoplasmique du rGHRH-R provenant de l'ADNc de RPR18c et d'apporter une preuve additionnelle de sa fonctionnalité, sa cinétique et son mécanisme d'internalisation suite à une activation par un agoniste du GHRH ont été étudiés dans les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c ou co-transfectées avec pAdV®. Ces études ont été réalisées à l'aide du ligand fluorescent, le Fluo-GHRH. Veyrat-Durebex et coll. (2003) ont démontré, par des études comparatives de l'internalisation du GHRH-R à l'aide de l'anticorps anti-GHRH-R(392-404) et du Fluo-GHRH dans les cellules hypophysaires de rat ainsi que dans les cellules BHK 570 transfectées avec le Zem219b-hGHRH-R, que ce ligand fluorescent constituait un outil sensible de visualisation du rGHRH-R. Les conditions d'expression optimales préalablement identifiées ont été étudiées, à savoir l'utilisation ou non du vecteur pAdV® en association avec une privation de 4 h en sérum, avant la récolte des cellules, pour l'essai de liaison avec le Fluo-GHRH. Afin de s'assurer de la spécificité du Fluo-GHRH pour le rGHRH-R dans notre système, la liaison non spécifique du Fluo-GHRH a été déterminée dans les deux conditions (Zem219b-RPR18c seul ou avec pAdV) en incubant les cellules

à 4°C pendant 40 min en absence ou en présence de 1  $\mu$ M hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>. L'élimination d'un maximum de fluorescence est obtenue à 4°C en présence de 1  $\mu$ M hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> (Fig. 9A (liaison totale) *versus* 9B (liaison non spécifique)). Dans les cellules BHK 570 sauvages, un taux très faible de fluorescence basale est observé en absence (Fig. 9C) et en présence (Fig. 9D) de 0.1  $\mu$ M hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>, indiquant que la fluorescence observée est spécifique au rGHRH-R.

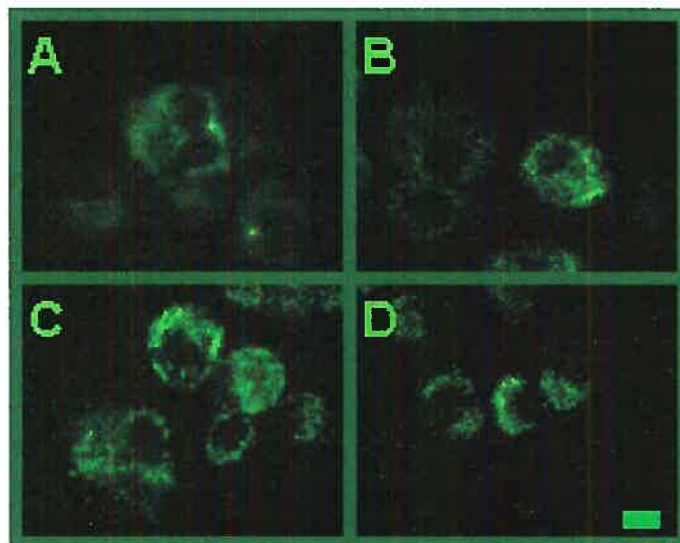
Les Figs. 10 et 11 présentent la cinétique d'internalisation du Fluo-GHRH dans les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c (Fig. 10 et Fig. 11 A) ou co-transfectées avec pAdV® (Fig. 11 B). Après 30 min d'incubation à 37°C (Fig. 10 A), aucune différence significative n'est observée comparativement à l'intensité et la distribution de la fluorescence du Fluo-GHRH à 4°C (Fig. 9 A (4°C) et Fig. 11 A et B). L'intensité maximale de fluorescence internalisée a été obtenue après une incubation de 60 min et demeure stable après 90 ou 120 min d'incubation à 37°C et ce, pour les deux conditions d'expression (Fig. 10 B à D et Fig. 11 A et B). La distribution de la fluorescence a également varié en fonction de la température. Lorsque les cellules étaient maintenues à 4°C durant une période de 40 min, la fluorescence demeurait plutôt diffuse à la surface de la membrane cytoplasmique, dû à une absence d'internalisation (Fig. 10 A). Cependant, lorsque les cellules étaient subséquemment incubées à 37°C durant 60 à 120 min., le Fluo-GHRH est internalisé et l'intensité de la fluorescence intracellulaire augmente dans le cytoplasme et se concentre au niveau des

**Fig. 9.** Représentation type de la fluorescence de surface du Fluo-GHRH dans les cellules BHK 570 transfectées ou non avec Zem219b-RPR18c.



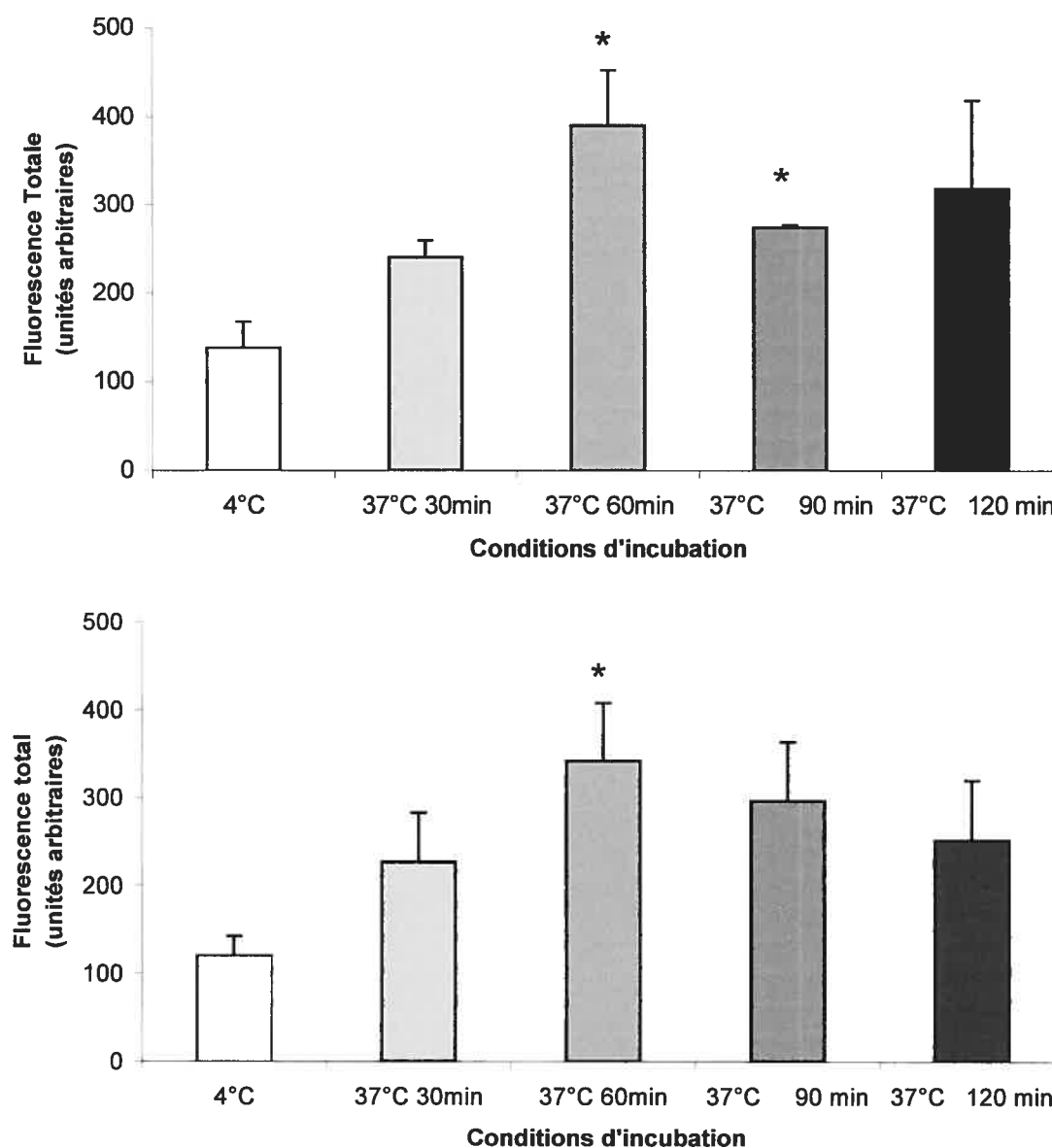
Les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c (A, B) et sauvages (C, D) ont été incubées à 4°C durant 40 min. en présence de 1 nM de Fluo-GHRH et en absence (A, C) ou présence (B, D) de 0.1  $\mu$ M hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>. Le temps d'exposition était de 2 sec. Représentations type de 3 expériences indépendantes. *Barre d'échelle*, 10  $\mu$ m.

**Fig. 10.** Représentation type de la cinétique d'internalisation du Fluo-GHRH dans les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c.



Fluorescence totale des cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c, suite à une incubation de 40 min à 4°C en présence de 1 nM du Fluo-GHRH suivie d'une incubation de 30 (A), 60 (B), 90 (C) et 120 min (D) à 37°C. Le temps d'exposition était de 2 sec. Représentation type de 3 expériences indépendantes. *Barre d'échelle*, 10  $\mu$ m.

**Fig. 11.** Cinétique d'internalisation du Fluo-GHRH dans les cellules BHK570 transfectées avec Zem219b-RPR18c



Fluorescence totale des cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c (A) ou avec Zem219b-RPR18c/pAdV (B) suite à une incubation de 40 min à 4°C en présence de 1 nM du ligand Fluo-GHRH suivie ou non d'une incubation de 30, 60, 90 et 120 min à 37°C. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes. \* $p < 0.05$  en comparaison à 4°C.



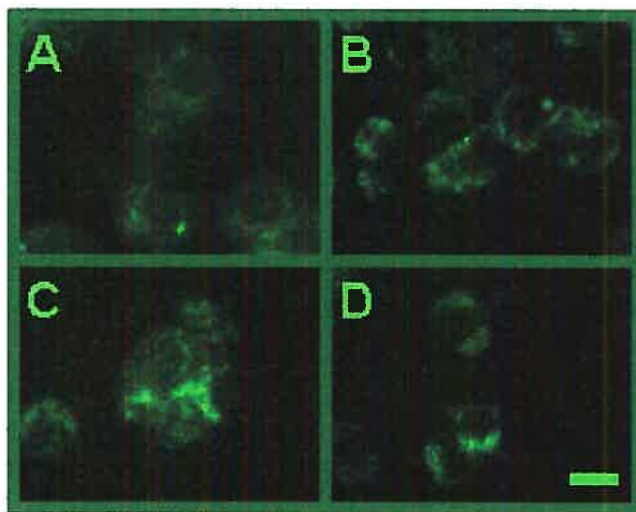
lysosomes (Fig. 10 B à D).

De plus, afin d'étudier de façon préliminaire le mécanisme d'internalisation du rGHRH-R dans les cellules BHK 570, certains inhibiteurs de l'internalisation ont été utilisés. Après 60 min. d'incubation à 37°C en présence de filipine III, un inhibiteur des cavéoles (Lobie et coll., 1999), la fluorescence est demeurée diffuse et distribuée à la surface membranaire (Fig. 12C). L'internalisation du Fluo-GHRH apparaît donc inhibée en présence de filipine. Cependant, en présence de 450 mM de sucrose, un inhibiteur de la voie d'internalisation dépendante des clathrines (Heuser, Anderson, 1989), celle-ci n'a pas été affectée (Fig. 12D).

### 3.4 Étude pharmacologique du rGHRH-R natif

Afin d'identifier les principaux pharmacophores des cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c, une étude de structure-affinité a été réalisée avec des analogues Ala- et D-monosubstitués du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>. Rappelons ici que les cellules transfectées de façon stable ont subi une carence en sérum de 4 h avant leur prélèvement pour l'essai de liaison. Les pharmacophores de liaison sont les aa du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> qui ont une haute importance pour la liaison du ligand au récepteur, alors que d'autres aa jouent un rôle dans le maintien d'une conformation optimale du ligand, permettant une liaison à haute affinité au récepteur. Une série d'analogues du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> dont les aa Tyr<sup>1</sup>, Asp<sup>3</sup>, Phe<sup>6</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Arg<sup>11</sup>, Lys<sup>12</sup>, Val<sup>13</sup>, Leu<sup>14</sup>, Leu<sup>17</sup>, Ala<sup>19</sup>

**Fig. 12.** Représentation type de la distribution du Fluo-GHRH dans les cellules BHK 570 transfectées avec rGHRH-R (Zem219b-RPR18c) en présence d'inhibiteur de l'internalisation.



Les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c (A, B, C, D) ont été incubées avec 10 nM de Fluo-GHRH à 4°C durant 40 min et lavées (A) ou incubées à 4°C pendant 40 min, lavées et réincubées à 37°C durant 60 min en absence d'inhibiteurs de l'internalisation (B), ou en présence de 16 nM de fillipine III (C) ou de 450 mM de sucrose (D). Représentation type de 3 expériences indépendantes. Le temps d'exposition a été de 2 sec. *Barre d'échelle*, 10  $\mu$ m.

Arg<sup>20</sup> et Lys<sup>21</sup> ont été substitués, soit par leur stéréoisomère de forme D ou par une Ala, ont été testés dans les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c. Ces analogues ont été choisis puisqu'ils sont des pharmacophores de liaison pour le GHRH-R dans l'hypophyse antérieure de rat (Tyr<sup>1</sup>, Asp<sup>3</sup>, Phe<sup>6</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Arg<sup>11</sup>, Lys<sup>12</sup>, Val<sup>13</sup>, Leu<sup>14</sup>, Leu<sup>17</sup>, Arg<sup>20</sup> et Lys<sup>21</sup>) (Lefrançois et coll., 1994) et pour le hGHRH-R transfecté dans les cellules BHK 570 (Phe<sup>6</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Val<sup>13</sup>, Leu<sup>14</sup>, Leu<sup>17</sup>, Ala<sup>19</sup> et Arg<sup>20</sup>) (données non publiées). Deux paramètres déterminent la catégorie dans laquelle s'inscrit l'aa : l'affinité relative de l'analogue et son facteur DA. L'affinité relative compare l'IC<sub>50</sub> moyen de l'analogue à celui du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> pour le rGHRH-R. Les affinités relatives des analogues du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> étudiés sont présentées au tableau 4. Les caractéristiques de la préparation membranaire des cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c, utilisées dans l'étude de structure-affinité étaient les suivantes : une liaison spécifique de 67 ± 10%, un K<sub>d</sub> de 1.02 ± 0.95 nM et un B<sub>max</sub> se situant entre 0.19 et 6.63 fmol/mg de protéine. Pour la série des analogues du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> D-monosubstitués, les plus importantes diminutions d'affinité relative ont été démontrées pour les aa Phe<sup>6</sup>, Val<sup>13</sup>, Ala<sup>19</sup> ou Arg<sup>20</sup> (IC<sub>50</sub> = 91.8-261.6 nM comparativement à 12.0 nM pour le hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>), soit de 7.7 à 21.8 fois ( $p < 0.05$ ). Une diminution moins importante de l'affinité relative (de 2.3 à 3.3 fois,  $p < 0.05$ ) a été observée pour les analogues D-monosubstitués Tyr<sup>1</sup>, Arg<sup>11</sup> ou Lys<sup>21</sup> (IC<sub>50</sub> = 27.1-39.3 nM). Cependant, l'affinité relative des analogues D-monosubstitués Asp<sup>3</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Lys<sup>12</sup>, Leu<sup>14</sup> ou Leu<sup>17</sup> n'était pas significativement différente de celle du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>. Par

**Tableau 4.** Affinité de liaison des analogues Ala et D-monosubstitués du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> dans les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR18c.

Substitution	IC <sub>50</sub> (nM)	Affinité relative (%)	Facteur DA
Aucune	12.0 ± 6.9	100 ± 57	----
Ala <sup>1</sup>	47.9 ± 1.6	25.1 ± 0.8	0.82
D-Tyr <sup>1</sup>	39.3 ± 5.2	30.7 ± 4.1	
Ala <sup>3</sup>	115.9 ± 1.1	10.4 ± 0.1	0.17
D-Asp <sup>3</sup>	19.7 ± 6.3	61.2 ± 19.6	
Ala <sup>6</sup>	71.3 ± 33.5	16.9 ± 7.9	1.63
D-Phe <sup>6</sup>	116.5 ± 17.6	10.3 ± 1.6	
Ala <sup>10</sup>	119.2 ± 43.8	10.1 ± 3.7	0.08
D-Tyr <sup>10</sup>	9.9 ± 1.6	121.1 ± 19.6	
Ala <sup>11</sup>	101.2 ± 11.9	11.9 ± 1.4	0.27
D-Arg <sup>11</sup>	27.1 ± 4.1	44.5 ± 6.7	
Ala <sup>12</sup>	46.6 ± 2.5	25.8 ± 1.4	0.24
D-Lys <sup>12</sup>	11.0 ± 1.9	109.1 ± 18.8	
Ala <sup>13</sup>	34.9 ± 3.6	34.5 ± 3.6	7.49
D-Val <sup>13</sup>	261.6 ± 42.8	4.6 ± 0.8	
Ala <sup>14</sup>	58.1 ± 9.3	20.7 ± 3.3	0.21
D-Leu <sup>14</sup>	12.4 ± 2.1	97.4 ± 19.5	
Ala <sup>17</sup>	487.6 ± 104.4	2.5 ± 0.5	0.04
D-Leu <sup>17</sup>	21.6 ± 3.1	55.7 ± 8.0	
Ala <sup>19</sup>	13.4 ± 0.2	89.8 ± 1.3	8.00
D-Ala <sup>19</sup>	107.2 ± 11.4	11.2 ± 1.2	
Ala <sup>20</sup>	143.8 ± 26.4	8.4 ± 1.5	0.64
D-Arg <sup>20</sup>	91.8 ± 18.0	13.1 ± 2.6	
Ala <sup>21</sup>	45.9 ± 9.0	26.2 ± 5.1	0.59
D-Lys <sup>21</sup>	27.2 ± 5.9	44.3 ± 9.6	

Chaque valeur d'IC<sub>50</sub> représente 3 expériences indépendantes effectuées en triplicata. IC<sub>50</sub> : concentration d'analogue inhibant 50% de la liaison spécifique du radioligand [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>10</sup>]hGHRH(1-44)NH<sub>2</sub>, tel que déterminé à l'aide du programme Ligand. L'affinité relative a été obtenue par le ratio de l'IC<sub>50</sub> de hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> / l'IC<sub>50</sub> moyen de l'analogue. Le facteur DA a été obtenue par le ratio de l'IC<sub>50</sub> de l'analogue D-monosubstitué / l'IC<sub>50</sub> de l'analogue Ala-monosubstitué.

ailleurs, concernant la série des analogues Ala-monosubstitués, une substitution en position Asp<sup>3</sup>, Phe<sup>6</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Arg<sup>11</sup>, Leu<sup>17</sup> ou Arg<sup>20</sup> a entraîné les plus fortes diminutions d'affinité relative, soit de 5.9 à 40.6 fois ( $p < 0.05$ ) ( $IC_{50} = 71.3-487.6$  nM) par rapport à celle du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>. Par ailleurs, les analogues Ala-monosubstitués Tyr<sup>1</sup>, Lys<sup>12</sup>, Val<sup>13</sup>, Leu<sup>14</sup> ou Lys<sup>21</sup> ont montré une diminution d'affinité relative de 2.9 à 4.8 fois ( $p < 0.05$ ) ( $IC_{50} = 13.4-58.1$  nM) par rapport au hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>.

Les  $IC_{50}$  ont permis d'obtenir le facteur DA de chaque analogue, définie par le rapport de l'affinités ( $IC_{50}$ ) des analogues D-monosubstitués sur celui des analogues Ala-monosubstitués. Un facteur DA élevé (>25) implique que les résidus du hGHRH sont critiques pour le maintien d'une conformation optimale du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> pour la liaison à haute affinité au récepteur (Lefrançois et coll., 1994). Aucun aa du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> étudié ne possède un facteur DA supérieur à 25. Par ailleurs, un faible facteur DA (<0.3) indique que ces résidus sont importants pour la liaison au récepteur (Lefrançois et coll., 1994). Ceci inclut les résidus Asp<sup>3</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Arg<sup>11</sup>, Lys<sup>12</sup>, Leu<sup>14</sup> et Leu<sup>17</sup>. Enfin, étant donné que les résidus Tyr<sup>1</sup>, Phe<sup>6</sup>, Arg<sup>20</sup> et Lys<sup>21</sup> possèdent des facteurs DA faibles ( $0.59 < DA < 1.63$ ) mais  $> 0.3$ , ils pourraient également être impliqués au niveau d'une liaison à haute affinité du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>, alors que Val<sup>13</sup> et Ala<sup>19</sup> ( $0.3 << DA < 25$ ) pourraient participer au maintien de la structure du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub>.

### 3.5 Mise au point des conditions d'expression des isoformes du GHRH-R de rat

Finalement, en utilisant les conditions d'expression mises au point pour le rGHRH-R natif, des essais de liaison préliminaires ont été menés sur des cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR2c et Zem219b-GHRH-R $\beta$ . Ils avaient pour but de déterminer si les conditions d'expression préétablies pour Zem219b-RPR18c étaient également optimales pour les deux isoformes du rGHRH-R. Deux conditions témoins ont été utilisées à chaque essai de liaison, soit une préparation membranaires de cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-hGHRH-R et avec Zem219b-RPR18c, pour fin de comparaison. Mentionnons ici que les conditions d'expression de Zem219b-RPR18c et de Zem219b-hGHRH-R impliquaient une incubation de 24 h dans un milieu DMEM normal (10% FBS, 1% pénicilline/streptomycine, 3.8  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup>) et une carence en sérum de 4 h avant le prélèvement des cellules pour les essais de liaison. Dans les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR2c ou Zem219b-GHRH-R $\beta$ , ces conditions n'ont pas permis une expression élevée de récepteurs fonctionnels, tel que suggéré par les taux de liaison spécifique de 32 et 36%, respectivement (tableau 5, condition 1). Une comparaison avec les paramètres de liaison des témoins positifs (liaison spécifique de 79 et 75% pour Zem219b-hGHRH-R et Zem219b-RPR18c, respectivement) dans ces mêmes conditions d'expression appuie ce résultat. Afin d'améliorer ces paramètres, deux modifications ont été apportées aux conditions d'expression préétablies : une incubation de 24 h en absence (tableau 5, condition 2) ou en présence (tableau

5, condition 3) de 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  préalable à une carence en sérum de 4 h et à l'essai de liaison sur homogénats de cellules BHK 570 transfectées. L'utilisation d'une concentration de zinc supérieure à celle présente dans le sérum utilisé (3.8  $\mu\text{M}$ ) pourrait favoriser un niveau d'expression plus élevé de récepteur, le promoteur étant inductible par ce métal alors que l'utilisation d'homogénat au lieu de préparations membranaires minimiserait les manipulations préalables à l'essai de liaison et favoriserait ainsi une plus grande stabilité des récepteurs. Les résultats de ces deux conditions d'expression sont présentés au tableau 5. Ainsi, la condition d'expression 2 a semblé plus efficace pour les isoformes Zem219b-RPR2c et Zem219b-GHRH- $\text{R}\beta$  tel que suggéré par leur taux de liaison spécifique de 45 et 47% respectivement. Des comparaisons préliminaires, d'abord avec le taux de liaison spécifique de Zem219b-RPR18c (76%) exprimé dans la même condition, indique des taux de 1.7 et 1.6 fois inférieurs pour Zem219b-RPR2c et Zem219b-GHRH- $\text{R}\beta$ , respectivement, mais des taux de 1.4 et 1.3 fois supérieurs à ceux obtenus en condition 1. Par ailleurs, la condition d'expression 3 avec des taux de liaison spécifique de 51 et 33% pour Zem219b-RPR2c et Zem219b-GHRH- $\text{R}\beta$ , respectivement a semblé plus efficace pour RPR2c, tel que suggéré par son taux de liaison spécifique de 1.3 fois inférieur à celui de Zem219b-RPR18c (67%) exprimé dans la même condition, mais de 1.6 fois supérieur à celui obtenu en condition 1. Le taux de liaison spécifique de l'isoforme GHRH- $\text{R}\beta$ , de 2.0 fois inférieur à celui de Zem219b-RPR18c dans la même condition et égale à celui obtenu en condition 1, appuie ce résultat. Il semble donc que les deux isoformes du rGHRH-R sont plus fragiles en

conditions *in vitro* que la forme native, puisque l'emploi d'homogénat de cellules transfectées avec Zem219b-RPR2c et Zem219b-GHRH-R $\beta$ , au lieu de préparations membranaires, augmente sensiblement leur taux de liaison spécifique. L'emploi d'une concentration de zinc de 20 $\mu$ M dans le milieu de culture pour une durée de 24 h semble également bénéfique à l'isoforme RPR2c. Finalement, une co-transfection de chacun des isoformes avec le vecteur pAdV® n'a pas augmenté leur niveau d'expression.



**Tableau 5.** Résultats d'essai de liaison dans des préparations membranaires ou homogénats de cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-RPR2c et Zem219b-GHRH-R $\beta$  du rGHRH-R en comparaison avec Zem219b-hGHRH-R et Zem219b-RPR18c.

Système d'expression	Condition d'expression	Liaison spécifique (%)
Zem219b-hGHRH-R	---	79.0 $\pm$ 7.1
Zem219b-RPR18c	1	75
	2	76
	3	67
Zem219b-RPR2c	1	32
	2	45
	3	51
Zem219b-RPR2c/pAdV	3	32
Zem219b-GHRH-R $\beta$	1	36
	2	47
	3	33
Zem219b-GHRH-R $\beta$ /pAdV	3	42

Chaque résultat provient d'une expérience effectuée en triplicata. Les conditions d'expression 1, 2 et 3 impliquent un essai de liaison dans une préparation membranaire de cellules BHK 570 ayant subi une carence en sérum de 4h avant leur prélèvement, un essai de liaison sur homogénat de cellules BHK ayant subi une carence en sérum de 4h avant leur prélèvement et un essai de liaison sur homogénat de cellules BHK, ayant été soumis à une incubation de 24 h, dans un milieu DMEM contenant 20 $\mu$ M de Zn<sup>2+</sup> en plus d'une carence en sérum de 4h avant leur prélèvement, respectivement.

## **4. DISCUSSION**

#### 4.1 Systèmes et conditions d'expression

Dans le but d'établir les profils de structure-affinité et de structure-activité du récepteur natif du GHRH de rat et de ses deux isoformes, des conditions d'expression ont été mises au point dans un système eucaryotique stable. Les ADNc du récepteur natif RPR18c et de ses deux isoformes RPR2c et GHRH-R $\beta$  ont d'abord été insérés dans le vecteur d'expression pcDNA3.1, choisi pour son promoteur fort dans les cellules eucaryotes, le CMV. Selon la littérature, l'ADNc RPR18c code pour le récepteur natif de 423 aa (Mayo, 1992) alors que les ADNc RPR2c (Mayo, 1992) et GHRH-R $\beta$  (Zeitler et coll., 1998) codent respectivement pour des isoformes de 464 aa contenant une insertion de 41 aa dans la troisième boucle intracytoplasmique, et de 480 aa comportant cette insertion de 41 aa en plus d'une délétion des 131 dernières pb (1278-1409), se traduisant par une substitution des cinq derniers aa de l'extrémité C-terminale et une extension de 17 aa.

Dans le but de vérifier l'identité de chacune des constructions, avant leur transfection dans la lignée eucaryote BHK 570, des études d'analyse de restriction ainsi que leur séquençage ont été faits. La différence de 123 pb entre pcDNA3.1-RPR18c et pcDNA3.1-RPR2c a été confirmée, pcDNA3.1-RPR2c étant l'isoforme longue décrite par Mayo (1992). Cependant, les analyses de restriction et de séquençage ont permis de révéler une homologie entre la forme native du rGHRH-R et l'isoforme GHRH-R $\beta$ . GHRH-R $\beta$  ne posséderait donc pas l'insertion de 123 pb tel que rapporté par Zeitler et coll. (1998). L'extrémité C-

terminale de GHRH-R $\beta$  demeure toutefois différente des autres formes, avec une substitution de ses cinq derniers aa et une extension de 17 aa. Ce résultat a été confirmé par le séquençage, les analyses de restrictions n'étant pas suffisamment sensibles. Ces résultats ne contrevenaient pas à la poursuite du projet puisque deux isoformes du GHRH-R demeurent présents dans l'hypophyse de rat et qu'ils possèdent chacun une modification structurale spécifique.

L'essai choisi pour confirmer l'expression de rGHRH-R membranaires fonctionnels suite aux transfections était un essai de liaison avec le radioligand [ $^{125}$ I-Tyr $^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH $_2$ . Certains paramètres préliminaires importants, obtenus avec ce type d'essai doivent être considérés, à savoir le pourcentage de liaison spécifique, indicatif de l'expression de récepteurs fonctionnels exprimés et le pourcentage B/T, indicatif de la concentration apparente de récepteur membranaire. Ces paramètres ont été utilisés pour la mise au point des conditions d'expression de la forme native (RPR18c) du rGHRH-R et de ses isoformes (RPR2c et GHRH-R $\beta$ ). D'autres paramètres de liaison ont également été considérés, soit le B $_{max}$ , représentatif de la concentration de récepteur dans la préparation, le K $_d$ , représentatif de l'affinité du radioligand [ $^{125}$ I-Tyr $^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH $_2$  et l'IC $_{50}$ , représentatif de l'affinité du rGHRH(1-29)NH $_2$  ou d'analogues du GHRH et correspondant à la concentration de peptide inhibant 50% de la liaison spécifique du radioligand [ $^{125}$ I-Tyr $^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH $_2$ . Cette technique permet donc de faciliter la comparaison entre différentes isoformes exprimées. L'essai

de liaison permet également d'éviter l'utilisation, pour les transfections stables et transitoires, d'ADNc liés à un épitope (Tag) permettant de quantifier le niveau d'expression protéique mais non la fonctionnalité. Il a ainsi été possible d'étudier le rGHRH-R et ses isoformes dans leur structure native.

Les premières transfections stables et transitoires dans les lignées eucaryotes BHK 570, HeLa et HEK 293 ont donné des résultats négatifs. Les conditions de l'essai de liaison n'ont pas été mises en cause étant donné les taux de liaison spécifique et de B/T élevés du témoin positif (cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-hGHRH-R). Les origines possibles de ces faibles résultats en essai de liaison pourraient impliquer un défaut de transcription des ADNc ou de traduction des ARNm. Afin de déterminer si la transcription était la source du problème, l'ARN total des cellules BHK 570, HeLa et HEK 293 transfectées avec pcDNA3.1-RPR18c a été soumis à un essai de protection à la RNase. Tel qu'indiqué par les résultats de RPA, l'ARNm du rGHRH-R était présente en forte concentration dans la lignée transfectées BHK 570, en faible concentration dans les cellules HeLa et absente dans les cellules HEK 293. L'hypothèse d'un défaut de transcription dans les cellules BHK 570 a ainsi pu être éliminée. Une localisation immunocytochimique a donc été effectuée afin de vérifier si l'efficacité de traduction était à l'origine des faibles taux de liaison spécifique du radiologand. Cette étude a toutefois démontré que le rGHRH-R était absent de la membrane cytoplasmique des cellules BHK 570 transfectées avec pcDNA3.1-RPR18c. L'hypothèse d'une inefficacité de traduction de l'ARNm de la forme native du rGHRH-R en une protéine mature et fonctionnelle

a donc été émise. Plusieurs facteurs peuvent influencer la traduction des protéines dans les cellules eucaryotes : une carence en acides aminés, la présence d'ARNm double brin ou une concentration élevée d'ARNm, une déficience en HEME et/ou un stress oxydatif au niveau du réticulum endoplasmique (RE). La plupart de ces éléments agissent de façon directe ou indirecte sur le facteur de traduction eIF-2, en activant différentes kinases qui le phosphorylent et le rendent inactif (Pathak et coll., 1988). Ainsi, la GCN2 (*general control non-derepressible-2*) est activée par une carence en acides aminés (Andersen et coll., 2002; Zhang et coll., 2002), la PKR (*double-stranded RNA-dependent protein kinase*) ou la DAI (*double RNA-activated inhibitor*) est activée par une concentration élevée en ARNm simple ou double brin suite à une transfection stable ou transitoire (Chang et coll., 2002), la HRI (*heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase*) est activée par une déficience en HEME (Han et coll., 2001) et la PERK (*dsRNA-dependent protein kinase(PKR)-like endoplasmic reticulum-resident kinase*) est activée par un stress au niveau du réticulum endoplasmique (Wu et coll., 2002). Dans le cas présent, une trop grande concentration d'ARNm simple brin a été le facteur le plus susceptible d'interférer au niveau de la traduction. De plus, la présence d'hormones et de facteurs de croissances peut également avoir pour effet d'inhiber la traduction par la voie des kinases PKR et DAI. Plusieurs facteurs de transcription (NF $\kappa$ B, CREB), ayant des sites de liaison dans le promoteur CMV du plasmide d'expression pcDNA3.1 utilisé (Meier et Stinski, 1996), peuvent être activés par des hormones (GH, œstrogène, insuline). Ainsi, CREB peut être activé par la

voie GRB2/RAS/ERK, elle-même activée par le récepteur de l'insuline (Klemm et coll., 2001) et/ou par la voie AMPc/PKA (Rosenberg et coll., 2002), elle-même activée par les récepteurs de l'œstrogène (Lazennec et coll., 2001) et de la GH (Sirotkin et coll., 2002) par exemple. Ces hormones sont toutes présentes dans le sérum foetal bovin, utilisé dans la culture des cellules BHK 570, ce qui pourrait avoir pour effet d'activer d'avantage la transcription du gène du rGHRH-R sous le contrôle du promoteur CMV et ainsi inhiber la traduction par la voie PKR et DAI, dû à la forte concentration d'ARNm.

Afin d'éviter la phosphorylation du facteur de traduction eiF-2, deux conditions de transfection et de culture cellulaire ont été évaluées. D'abord, les cellules BHK 570 ont été co-transfectées avec pcDNA3.1-RPR18c et le vecteur commercial, le pAdV®. Ce vecteur agit en produisant un ARNm, le VAI qui se lie à la DAI et l'empêche de phosphoryler le facteur de traduction eiF-2 (Grokreutz et coll., 1994; Kitajewski et coll., 1986; O'Malley et coll., 1986; Farrell et coll., 1977). Le système de pAdV® a donc pour effet de favoriser la synthèse protéique. Les résultats positifs obtenus en essai de liaison (liaison spécifique de 62% et B/T de 11.2 %) supportent que la phosphorylation du facteur de traduction eiF-2 par la DAI pourrait être une cause des résultats négatifs initiaux. Étant donné qu'aucune autre condition d'expression n'a été modifiée en parallèle, il a été possible de suggérer que la présence d'une grande concentration d'ARNm causée par la transfection stable serait à l'origine de l'inhibition de eiF-2. La deuxième condition évaluée consistait en une carence en

sérum de 4 hs, imposée aux cellules BHK 570 transfectées de façon stable avec pcDNA3.1-RPR18c, avant leur prélèvement pour l'essai de liaison. Cette condition a permis de vérifier si les hormones contenues dans le sérum ajouté au milieu de culture étaient impliquées dans l'inhibition de la traduction observée *via* la PKR et la DAI. Le résultat positif en essai de liaison pour les cellules BHK 570 transfectées avec pcDNA3.1-RPR18c (liaison spécifique de 53% et B/T de 8.6%) pour cette condition supporte également l'hypothèse initiale.

Émettant l'hypothèse que le promoteur CMV du plasmide d'expression pcDNA3.1 est la cause de la concentration élevée d'ARNm du rGHRH-R dans les cellules BHK 570 transfectées, un plasmide d'expression avec un promoteur inductible, le Zem219b a été utilisé. L'expression du gène contenu dans ce vecteur est inductible par le zinc et le cadmium (Palmiter et coll., 1994; Smirnova et coll., 2000). Ce promoteur contient plusieurs éléments de réponse à des métaux (MRE) pouvant être liés par le facteur de transcription MTF-1 (*metallothionein factor-1*). Cette protéine possède 6 doigts de zinc du type Cys<sup>2</sup>-His<sup>2</sup> et est exprimée dans les cellules BHK 570 utilisées (Vallee et coll., 1993). Ce promoteur permettrait donc de contrôler la concentration d'ARNm *via* la concentration en métaux dans le milieu. Les deux conditions étudiées précédemment ont donc été combinées, avec l'utilisation de ce nouveau plasmide, pour effectuer une transfection stable des cellules BHK 570 avec Zem219b-RPR18c. Ces conditions d'expression se sont avérées adéquates avec les résultats positifs en essai de liaison sans pAdV® (liaison spécifique de



$64 \pm 1\%$ ,  $IC_{50}$  de  $2.00 \pm 0.77$  nM,  $K_d$  de  $0.84 \pm 0.59$  nM,  $B_{max}$  de  $1.05 \pm 0.51$  pmol/mg de protéine et B/T de  $11.7 \pm 1.6\%$ ) et avec pAdV® (liaison spécifique de  $74 \pm 4\%$ ,  $IC_{50}$  de  $2.79 \pm 0.50$  nM,  $K_d$  de  $1.06 \pm 0.11$  nM,  $B_{max}$  de  $1.88 \pm 0.14$  pmol/mg de protéine et B/T de  $17.3 \pm 1.5\%$ ).

Les premières données en essai de liaison, déterminant que le mode d'expression décrit de Zem219b-RPR18c dans les cellules BHK 570 permettait d'obtenir un récepteur fonctionnel ont été supportées par des essais de liaison, à l'aide d'un ligand fluorescent, le fluo-GHRH. Notons que l'internalisation d'un récepteur membranaire peut être un indicateur de sa fonctionnalité, puisque l'étape précédant ce phénomène est la liaison avec son ligand. L'internalisation des récepteurs membranaires de façon agoniste-dépendante constitue l'un des trois mécanismes connus de désensibilisation des récepteurs membranaires (Anborgh et coll., 2000). Le découplage de récepteurs des protéines G hétérotrimériques, par la palmitoylation de cystéines en C-terminal (Bouvier et coll., 1988) et la régulation à la baisse du récepteur suite à une réduction de la synthèse d'ARNm et de protéine, ainsi que la dégradation des récepteurs existants par la voie lysosomale (Pak et coll., 1999) constituent les deux autres mécanismes de désensibilisation. De façon générale, la désensibilisation de récepteurs membranaires suite à une stimulation par un agoniste est une propriété ubiquitaire des systèmes biologiques, qui prévient la surstimulation des récepteurs et l'épuisement cellulaire.

Ainsi, l'internalisation du rGHRH-R s'est révélée dépendante de la température dans les cellules BHK 570 transfectées avec le rGHRH-R. Une fluorescence diffuse à la membrane était présente lors d'une incubation à 4°C, alors qu'une fluorescence de type granulaire et de plus forte intensité était visible suite à une incubation à 37°C, reflétant une accumulation du Fluo-GHRH dans certains compartiments intracellulaires. Cette internalisation atteint un maximum après 60 min. d'incubation à 37°C, pour se stabiliser après 90 et 120 min. Ce profil d'internalisation du rGHRH-R est similaire à celui du récepteur du GHRH étudié dans les cellules dispersées d'hypophyse antérieure de rat (Veyrat-Durebex et coll., 2003). La prédominance de la forme de 423 aa du GHRH-R dans les cellules somatotropes (Miller et coll., 1999) est compatible avec le présent résultat. De plus, l'inhibition de l'internalisation du rGHRH-R par la fillipine et l'absence d'inhibition de l'internalisation par le sucrose suggère qu'elle est liée à la voie des cavéoles (Veyrat-Durebex et coll., 2003). Ce processus d'internalisation est également identique à celui du GHRH-R hypophysaire de rat (Veyrat-Durebex et coll., 2003). Ainsi, les résultats indiquent que le récepteur natif du rGHRH-R provenant de la transfection stable de l'ADNc RPR18c dans les cellules BHK 570 est fonctionnel puisqu'il s'internalise suite à son activation par le GHRH en fonction du temps et de la température d'incubation, et semble emprunter une voie spécifique d'internalisation.

Des études d'internalisation pour le récepteur du hGHRH-R transfecté dans les cellules BHK 570 ont également été effectuées (Veyrat-Durebex et coll.,

2003). Le patron d'internalisation de ce récepteur est aussi dépendant de la température et du temps d'incubation (Veyrat-Durebex et coll., 2003). La fluorescence est plus intense et en granules à 37°C, avec une internalisation maximale entre 60 et 90 min. Par ailleurs, ces études ont démontré que l'internalisation est dépendante de la voie des clathrines (Veyrat-Durebex et coll., 2003), suggérant que le processus d'internalisation ligand-dépendant pourrait être différent selon la structure primaire du récepteur. En effet, malgré le 82% d'homologie entre les récepteurs du GHRH de rat et humain (Mayo et coll., 1995), de nombreuses différences existent au niveau de l'extrémité C-terminale intracellulaire. Notons entre autre une cystéine en position 405 du rGHRH-R hypophysaire qui est absente chez l'humain (Mayo et coll., 1992 et 1995). Cette cystéine dans le rGHRH-R pourrait être palmitoylée (Mayo et coll., 1996; Probst et coll., 1992). La palmitoylation des cystéines est un phénomène retrouvé chez plusieurs récepteurs de la famille des récepteurs couplés aux protéines G, tel que les récepteurs  $\beta$ 2-adrénergique (Moffett et coll., 1996) et  $\alpha$ 2-adrénergique (Eason et coll., 1994), les récepteurs de la rhodopsine (Ovchinnikov et coll., 1988), B de l'endothéline et B<sub>2</sub> de la bradykinine (Godovac-Zimmermann et coll., 1999), de l'hormone lutéinisante (LH) et de la gonadotrophine chorionique humaine (HCG) (Kawate et coll., 1994 ; Zhu et coll., 1995), V<sub>2</sub> de la vasopressine (Sadeghi et coll., 1997), D<sub>1</sub> de la dopamine (Jin et coll., 1999), du récepteur métabotrope 4 et 6 du glutamate (Alaluf et coll., 1995 ; Pickering et coll., 1995) ainsi que celui de la thyrotrophine (Tanaka et coll. 1998). Il a été proposé que le groupement acyl ajouté lors de la palmitoylation permettrait la formation

d'une quatrième boucle intracellulaire, par son insertion dans la membrane cytoplasmique (Moench et coll., 1994). Cette boucle favoriserait entre autre le couplage du récepteur aux protéines G (O'Dowd et coll., 1989; Okamoto et coll., 1997), l'expression du récepteur (Sagedhi et coll., 1997; Van Koppen et coll., 1991), la phosphorylation de sérines et de thréonines situés dans l'extrémité C-terminale (Moffett et coll., 1993) ainsi que la désensibilisation/régulation à la baisse induite par la liaison d'un agoniste (Tanaka et coll., 1998; Kawate et coll., 1994; Zhu et coll., 1995; Eason et coll., 1994; Schülein et coll., 1996; Moffett et coll., 1996). Des évidences indiquent que ce mécanisme pourrait s'appliquer au rGHRH-R hypophysaire. Tout d'abord, il a été démontré que la cérulenine, un inhibiteur de la palmitoylation, inhibait l'internalisation du rGHRH-R dans les cellules somatotropes, alors qu'elle n'avait pas d'effet dans les cellules BHK 570 transfectées avec Zem219b-hGHRH-R (Veyrat-Durebex et coll., 2003; Saermark et coll., 1990). La cystéine entraînerait l'internalisation du récepteur de façon agoniste-dépendante, en favorisant de façon séquentielle sa palmitoylation et la formation de la quatrième boucle intracytoplasmique. Cette quatrième boucle pourrait favoriser l'activation du processus d'endocytose par la voie des cavéoles, mais le mécanisme précis demeure inconnu jusqu'à présent. La présence d'une cystéine en position 405 dans la séquence du récepteur natif de 423 aa étudié dans les cellules BHK 570 (Mayo, 1992), l'abondance de son ARNm dans les cellules somatotropes d'hypophyse de rat (Mayo, 1992) ainsi que la ressemblance de son profil d'internalisation avec celui observé dans les cellules somatotropes suggèreraient que son internalisation pourrait impliquer la

palmitoylation de cette cystéine.

#### **4.2. Étude pharmacologique du rGHRH-R natif**

Ayant établi la fonctionnalité du rGHRH-R de 423 aa par deux approches méthodologiques, soit des essais de liaison avec un radioligand et un fluoroligand, des études de structure-affinité avec des analogues Ala- et D-monosubstitués du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> ont été entreprises avec le rGHRH-R natif de 423 aa, exprimé dans les cellules BHK 570. Malgré le fait qu'il convient de suggérer que parmi les conditions d'expression du récepteur natif, sa co-transfection avec pAdV® a été la meilleure solution, la condition d'expression n'utilisant pas le vecteur pAdV® a été choisie pour les essais de liaison subséquents afin d'éviter toutes interférences potentielles du vecteur pAdV® dans les résultats sur le rGHRH-R. Ce choix s'est basé sur l'absence de différences significatives entre les paramètres d'affinité (IC<sub>50</sub> et K<sub>d</sub>) des deux conditions d'expression de Zem219b-RPR18c. De plus, l'absence d'effet potentiateur de l'expression du GHRH-R par pAdV® après 5 à 10 passages cellulaires appuie également cette décision. Des études de compétition avec le hGHRH-R transfectés dans les cellules BHK 570 (manuscrit en préparation; résumé publié) ainsi que dans des homogénats d'hypophyse antérieure de rat (Lefrançois et coll., 1994), à l'aide de tous les analogues monosubstitués du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> (où chacun des 29 aa ont été substitués par leur stéréoisomère de forme D ou par une alanine) ont permis d'identifier les résidus importants pour la liaison du ligand à ces récepteurs et/ou pour le maintien d'une

conformation optimale du ligand, permettant une liaison à haute affinité à ces récepteurs. Ces résidus cruciaux sont identifiés par le facteur DA de chaque analogue, découlant des études de structure-affinité et défini par le rapport de l'affinité ( $IC_{50}$ ) des analogues D-monosubstitués sur celui des analogues Ala-monosubstitués. Un facteur DA élevé ( $>25$ ) implique que les résidus sont critiques pour le maintien d'une conformation optimale du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> pour une liaison à haute affinité au récepteur (Lefrançois et coll., 1994) alors qu'un faible facteur DA ( $<0.3$ ) indique que les résidus sont importants pour la liaison au récepteur (Lefrançois et coll., 1994). En ce qui concerne le hGHRH-R hypophysaire, la littérature rapporte que les résidus cruciaux du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> pour la liaison du ligand au récepteur seraient Tyr<sup>1</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Arg<sup>11</sup>, Lys<sup>12</sup>, Leu<sup>14</sup> et Leu<sup>17</sup>, que Val<sup>13</sup> serait le seul résidu responsable du maintien de la conformation optimale du ligand et que Asp<sup>3</sup>, Phe<sup>6</sup>, Ala<sup>19</sup>, Arg<sup>20</sup> et Lys<sup>21</sup> sembleraient être impliqués dans les deux fonctions (manuscrit en préparation; résumé publié). Pour le rGHRH-R hypophysaire, il a été rapporté que les résidus importants du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> pour la liaison du ligand au récepteur seraient Tyr<sup>1</sup>, Asp<sup>3</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Arg<sup>11</sup>, Lys<sup>12</sup>, Leu<sup>14</sup>, Leu<sup>17</sup>, Arg<sup>20</sup> et Lys<sup>21</sup>, que les résidus cruciaux pour le maintien de la conformation optimale du ligand serait Val<sup>13</sup> et Ala<sup>19</sup>, alors que Phe<sup>6</sup> jouerait les deux rôles (Lefrançois et coll., 1994). Tous les analogues monosubstitués du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> aux positions cruciales pour la liaison au hGHRH-R ainsi qu'au rGHRH-R, en plus des résidus Phe<sup>6</sup>, Val<sup>13</sup> et Ala<sup>19</sup>, ont été évalués dans le cours de cette étude avec le rGHRH-R de 423 aa, permettant une comparaison avec la littérature. Les études de structure-affinité

avec le rGHRH-R de 423 aa, transfecté dans les cellules BHK 570, a permis d'identifier que les résidus Asp<sup>3</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Arg<sup>11</sup>, Lys<sup>12</sup>, Leu<sup>14</sup> et Leu<sup>17</sup> seraient impliqués dans la liaison du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> au récepteur natif, avec des facteurs DA inférieurs à 0.3 (0.04 - 0.27), que les résidus Tyr<sup>1</sup>, Phe<sup>6</sup>, Arg<sup>20</sup> et Lys<sup>21</sup> pourraient être impliqués dans la liaison au récepteur avec des facteurs DA entre 0.59 et 1.63 et que Val<sup>13</sup> et Ala<sup>19</sup> pourraient être impliqués dans les deux rôles avec des facteurs DA entre 7.49 et 8.00.

De cette étude, il a été possible de suggérer que les profils de structure-affinité du rGHRH-R hypophysaire et du rGHRH-R de 423 aa transfecté dans les cellules BHK 570 sont identiques pour les résidus Tyr<sup>1</sup>, Asp<sup>3</sup>, Phe<sup>6</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Arg<sup>11</sup>, Lys<sup>12</sup>, Leu<sup>14</sup>, Leu<sup>17</sup>, Arg<sup>20</sup> et Lys<sup>21</sup> mais partiellement différents pour les résidus Val<sup>13</sup> et Ala<sup>19</sup>. Par ailleurs, les profils de structure-affinité du hGHRH-R et du rGHRH-R de 423 aa transfecté dans les cellules BHK 570 sont identiques pour les résidus Tyr<sup>1</sup>, Tyr<sup>10</sup>, Arg<sup>11</sup>, Lys<sup>12</sup>, Leu<sup>14</sup>, Leu<sup>17</sup> et Ala<sup>19</sup>, mais partiellement différents pour les résidus Asp<sup>3</sup>, Phe<sup>6</sup>, Val<sup>13</sup>, Arg<sup>20</sup> et Lys<sup>21</sup>.

Les différences entre les profils pharmacologiques du rGHRH-R hypophysaire (Lefrançois et coll., 1994) et du rGHRH-R de 423 aa transfecté dans les cellules BHK 570 pourraient être reliées à la multiplicité des formes du GHRH-R présentes dans les cellules somatotropes de rat. Cette multiplicité pourrait engendrer certaines modifications des profils pharmacologiques des formes étudiées individuellement. En effet, trois formes du GHRH-R (la forme

**Tableau 6 :** Comparaison des résidus du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> impliqués dans la liaison (pharmacophores de liaison) et/ou dans le maintien d'une conformation optimale du hGHRH(1-29)NH<sub>2</sub> dans le but d'une liaison à haute affinité (structure du ligand) aux hGHRH-R, au rGHRH-R de l'hypophyse antérieure et au rGHRH-R de 423 aa transfecté dans les cellules BHK 570.

	hGHRH-R cellules BHK570		rGHRH-R hypophyse antérieure de rat		rGHRH-R cellules BHK 570	
	Liaison	Structure	Liaison	Structure	Liaison	Structure
Tyr <sup>1</sup>	X		X		X	
Asp <sup>3</sup>	X	X	X		X	
Phe <sup>6</sup>	X	X	X	X	X	
Tyr <sup>10</sup>	X		X		X	
Arg <sup>11</sup>	X		X		X	
Lys <sup>12</sup>	X		X		X	
Val <sup>13</sup>		X		X	X	X
Leu <sup>14</sup>	X		X		X	
Leu <sup>17</sup>	X		X		X	
Ala <sup>19</sup>	X	X		X	X	X
Arg <sup>20</sup>	X	X	X		X	
Lys <sup>21</sup>	X	X	X		X	



native de 423 aa avec ses deux isoformes de 464 et de 480 aa) ont été identifiées dans l'hypophyse de rat avec une prédominance de la forme courte de 423 aa (Mayo, 1992; Zeitler et coll., 1998). Les évidences actuelles suggèrent que les deux isoformes du rGHRH-R ont une fonctionnalité (accumulation d'AMPc) différente de la forme native de 423 aa : l'isoforme de 464 aa n'induisant pas d'accumulation d'AMPc (Miller et coll., 1999) alors que celle de 480 aa induirait une accumulation d'AMPc supérieure de 71% à celle induite par la forme native (Zeitler et coll., 1998). Cette divergence d'activité biologique a également été observée avec d'autres récepteurs couplés aux protéines G. Mentionnons les deux isoformes du récepteur D<sub>2</sub> dopaminergique, générées par épissage alternatif et dont la structure diffère par une insertion de 29 aa dans la troisième boucle intracytoplasmique (Giros et coll. 1989; Montmayeur et coll. 1993), qui interagiraient avec différentes protéines G (Montmayeur et coll. 1993). Il en est de même pour les cinq isoformes du récepteur PACAP, possédant toutes des insertions dans la troisième boucle intracytoplasmique (Spengler et coll. 1993) qui seraient fonctionnellement différentes par leur couplage, soit avec l'adénylate cyclase ou la phospholipase C (Spengler et coll. 1993). Ces divergences d'activité entre les isoformes et leur forme native suggèrent des structures tridimensionnelles différentes au niveau des domaines intracytoplasmiques, pouvant se répercuter sur les domaines de liaison de leur ligand respectif. Le cas de l'isoforme de porc du GHRH-R appuie cette hypothèse. Cette isoforme, possédant une modification de ses 5 derniers aa avec un ajout de 28 aa dans le domaine C-terminal intracytoplasmique, lierait

avec une affinité beaucoup moins élevée le GHRH comparativement à la forme native, lorsqu'il était transfecté seul (Hassan et coll., 2001).

Cette multiplicité fonctionnelle peut être illustrée par les diminutions d'affinité du GHRH-R observés dans l'hypophyse au cours du vieillissement chez le rat. D'abord, une diminution de la sensibilité des cellules somatotropes au GHRH chez les rongeurs (Ceda et coll., 1986 ; Deslauriers et coll., 1991 ; Sonntag et coll., 1980 ; Takahashi et coll., 1987) et les humains (Finkelstein et coll., 1972 ; Ho et coll., 1987 ; Lang et coll., 1987 ; Corpas et coll., 1993 ; Rudman et coll., 1985) a été rapporté au cours du vieillissement. En effet, une diminution de la réponse hypophysaire en GH induite par le GHRH est remarquée chez les rats de 12 mois ainsi qu'*in vitro* dans les cellules hypophysaires de rats de 12 et 20 mois, alors que la réponse est absente *in vivo* chez les rats de 20 mois (Deslauriers et coll., 1991). Comme la machinerie intracellulaire impliquée dans la sécrétion de la GH n'est pas altérée avec l'âge dans les cellules somatotropes de rat, il a été postulé que la diminution de sécrétion de GH résulte d'une incapacité à stimuler efficacement les cellules somatotropes plutôt que d'un défaut au niveau des mécanismes de sécrétion de cette hormone (Walker et coll., 1991). Cette incapacité impliquerait le mécanisme d'activation du GHRH-R et non celui de la sécrétion de GH (Ceda et coll. 1986). Des évidences ont démontré une augmentation transitoire du nombre de sites de liaison à basse affinité du GHRH-R chez les rats de 14 mois, en plus d'une disparition des sites à haute affinité chez les rats de 18 mois, comparativement aux rats de 2 mois

(Gaudreau et coll. 1999, Abribat et coll. 1991). Le changement des caractéristiques fonctionnelle du GHRH-R pourrait représenter l'une des premières causes menant à la diminution de la production d'AMPc induite par le GHRH chez les rats âgés, impliquant possiblement une modification des ratios d'isoformes (Lefrançois et coll., 1995). Ainsi, de part leur multiplicité fonctionnelle, les formes du rGHRH-R pourraient donner un patron global lorsque toutes présentes à la membrane.

Cette multiplicité de formes du rGHRH-R à la membrane des cellules somatotropes suggère également la possibilité d'homo ou d'hétérodimérisation. Des évidences rapportées pour d'autres récepteurs de la sous-famille BIII des récepteurs couplés aux protéines G, à savoir ceux de la sécrétine (Ding, Cheng et coll. 2002; Ding, Kuntz et coll. 2002) et du GHRH humain (Motomura et coll. 1998) indiquent que, dans certaines situations physiopathologiques, l'affinité et/ou la réponse biologique d'une forme native d'un récepteur est modifiée lorsqu'elle est mise en présence d'un ou plusieurs de ses isoformes. Pour le récepteur de la sécrétine, aucune réponse biologique n'a été détectée à des concentrations élevées de sécrétine lorsque son isoforme, comportant un troncage du troisième exon, était transfecté seul ou co-transfecté avec le récepteur natif (Ding, Cheng et coll. 2002; Ding, Kuntz et coll. 2002). Ding, Cheng et coll. (2002) ont de plus démontré, par la technique de *Bioluminescence resonance energy transfer* (BRET), que l'isoforme du récepteur de la sécrétine pouvait former un hétérodimère avec le récepteur natif et supprimer toute action

de la sécrétine sur celui-ci. Concernant le récepteur hypophysaire du GHRH humain, une cotransfection du récepteur natif avec son isoforme de 4 Kb diminue de près de 60% le taux d'accumulation d'AMPc engendré par l'activation du récepteur natif (Motomura et coll. 1998). Ce phénomène de dominance négative semblerait, dans les deux cas, favorisé par la dimérisation de l'isoforme avec le récepteur natif fonctionnel qui est un phénomène répandu chez les récepteurs couplés aux protéines G, modifiant leur structure tridimensionnelle (Gouldson et coll., 2000; Salahpour et coll., 2000; Hébert et coll., 1998). Ainsi, sur la base des résultats de structure-affinité obtenus pour le rGHRH-R hypophysaire (Lefrançois et coll., 1994) comparativement à ceux obtenus pour le récepteur de 423 aa transfecté dans les cellules BHK 570, sur le phénomène d'hétérodimérisation des récepteurs de la sous-famille BIII et sur les divergences de fonctionnalité entre récepteurs natifs et isoformes, il est possible de suggérer que la multiplicité des formes du GHRH-R dans les cellules somatotropes pourrait participer aux différences de profil observées.

Les différences pharmacologiques observées entre le hGHRH-R et le rGHRH-R natif de 423 aa pourraient être expliquées par les divergences entre les séquences en aa des deux récepteurs. De façon générale, plusieurs études faites en mutant des aa présumément importants pour la liaison avec le ligand, ou en construisant des récepteurs chimériques à l'aide de domaines provenant de récepteurs apparentés ont permis de cibler des domaines responsables de ce contact avec le ligand dans plusieurs familles de récepteurs. Momamy et coll.

(1996) ont identifié que, pour le hGHRH-R, les résidus 26 à 40, situés dans la région N-terminale extracellulaire, formeraient une hélice  $\alpha$  qui interagirait avec une seconde hélice  $\alpha$ , formée par les résidus 13 à 23 du GHRH. Trois aa sur quatorze (Leu<sup>26</sup>, Asp<sup>36</sup> et Leu<sup>39</sup> pour le rGHRH-R de 423 aa; Pro<sup>26</sup>, Glu<sup>36</sup> et Ser<sup>39</sup> pour le hGHRH-R) sont différents entre les récepteurs hGHRH-R et rGHRH-R de 423 aa dans leur portion 26-40 de l'extrémité N-terminale (Mayo, 1992). De plus, les boucles extracellulaires, ainsi que les domaines transmembranaires, sont également importants pour le contact avec le ligand (Holtmann, Ganguli et coll., 1996; Hashimoto et coll., 1997, DeAlmeida et coll., 1998). DeAlmeida et coll. (1998) ont émis l'hypothèse que la portion N-terminale du GHRH-R humain établit un premier contact avec le ligand, alors que les boucles extracellulaires et les domaines transmembranaires seraient impliqués dans des interactions subséquentes, déterminant la spécificité du récepteur pour son ligand. En examinant les différences de chacun des domaines du hGHRH-R et du rGHRH-R, il en ressort que l'extrémité N-terminale (72%), le deuxième domaine transmembranaire (80%) et la première boucle extracellulaire (73%) ont les plus faibles taux d'homologie (Mayo 1992). Le premier (87%), quatrième (91%) et septième (91%) domaine transmembranaire ainsi que la deuxième (88%) et troisième (91%) boucle extracellulaire possèdent pour leur part des niveaux d'homologie plus élevés (Mayo, 1992). Afin d'illustrer l'importance de chaque domaine ou aa dans la structure tridimensionnelle d'un récepteur, DeAlmeida et coll. (1998) ont rapporté que le troncage (à partir de l'aa 156, début de la première boucle intracytoplasmique) ou le remplacement de l'extrémité C-

terminale du GHRH-R par celle d'un récepteur de la sous-famille BIII (VIP et sécrétine) empêche le contact avec le ligand. Notons que 79% d'homologie existe entre les domaines C-terminaux du GHRH-R humain et de rat (Mayo, 1992). De plus, Momany et coll. (1996) ont démontré qu'un troncage de la première boucle intracytoplasmique chez les récepteurs de la sous-famille B-III empêchait une liaison à haute affinité du ligand au récepteur (Momamy et coll., 1996). Aucune différence en aa n'est cependant présente entre le hGHRH-R et le rGHRH-R dans cette boucle intracytoplasmique. Enfin, mentionnons que des aa spécifiques tel que les cystéines dans l'extrémité N-terminale formant des ponts disulfures (Laburthe et coll., 1996), l'acide aspartique en position 196 du récepteur du VIP (Du et coll., 1997) et la lysine en position 173 du récepteur de la sécrétine (Vilardaga et coll., 1996), dans la première boucle extracellulaire, permettent le maintien d'une structure tridimensionnelle favorable au contact du ligand. Toutes ces observations permettent de postuler que les différences observées entre les profils pharmacologiques du hGHRH-R et de rGHRH-R de 423 aa pourraient impliquer les divergences notés au niveau des structures tridimensionnelles.

#### **4.4 Conditions d'expression des isoformes du GHRH-R de rat**

Afin de valider l'hypothèse initiale, à savoir que les isoformes pourraient présenter un profil pharmacologique différent de celui de la forme native du rGHRH-R, les conditions d'expression des deux isoformes du rGHRH-R ont d'abord été mises au point. Les résultats préliminaires obtenus avec les

conditions d'expression préétablies pour la forme native de 423 aa, n'ont pas permis d'obtenir des paramètres de liaison comparables avec les ADNc RPR2c ou GHRH-R $\beta$  transfectées dans les cellules BHK 570. Des conditions alternatives ont alors été étudiées, soit un essai de liaison sur homogénat de cellules BHK570 ayant subi une carence en sérum de 4h, avant leur prélèvement et un essai de liaison sur homogénat de cellules BHK ayant subi une incubation de 24 h dans un milieu DMEM, contenant 20 $\mu$ M de Zn<sup>2+</sup> en plus d'une carence en sérum de 4h avant leur prélèvement. L'utilisation de ces conditions d'expression était basée sur le fait que les isoformes du rGHRH-R pourraient être plus instables lorsque transfectées individuellement ou alors que le niveau d'expression des isoformes pourrait ne pas être aussi optimal que pour la forme native de 423 aa. L'utilisation d'homogénat de cellules BHK 570 transfectées avec chaque isoforme individuellement, au lieu de préparation membranaire, lors des essais de liaison et d'une concentration plus élevée de Zn<sup>2+</sup> dans le milieu de culture (20  $\mu$ M au lieu de 3.8  $\mu$ M) ont permis d'obtenir des taux de liaison spécifique de 45 et 51% pour RPR2c et de 47 et 33% pour GHRH-R $\beta$ , respectivement. Considérant que les conditions d'expression étudiées pour les isoformes ne permettent pas une expression optimale de récepteurs fonctionnels tel que pour la forme native de 423 aa, des stratégies de poursuite de l'étude impliquant les optimisations de la concentration de Zn<sup>2+</sup> dans le milieu de culture, du temps d'incubation des cellules BHK 570 transfectées dans ce même milieu, ainsi que des conditions favorisant une meilleure stabilité des récepteurs (essai de liaison sur cellules entières par exemple) devront être envisagées.

Sachant que le GHRH possède de multiples effets sur l'hypophyse, entre autre sur la synthèse et la sécrétion de la GH (Kovacs et coll., 2002), sur la prolifération des cellules somatotropes par un mécanisme AMPc-dépendant et/ou par la voie des MAPK (Mayo et coll., 1988; Struthers et coll., 1991; Lin et coll., 1993; Lin et coll., 1992; Zeitler et coll., 2000; Pombo et coll., 2000; Lee et coll., 2001), sur l'expression du gène *c-fos* (Billestrup et coll., 1987), et sur la différenciation des cellules somatotrophes au cours du développement embryonnaire chez les mammifères (Dean et coll., 1999), il est possible de suggérer que les formes du GHRH-R pourraient fournir l'infrastructure à plusieurs voies de signalisation intracellulaire en réponse au GHRH. Les différences de fonctionnalité entre des isoformes du GHRH-R de rat par rapport à la forme native (Miller et coll., 1999; Zeitler et coll., 1998) appuient ce fait. D'abord, des études ont montré l'importance de la troisième boucle intracytoplasmique dans l'activation des protéines G, dans la spécificité du ligand ainsi que dans l'internalisation du récepteur suite à son activation (Stefan et coll., 1994). De plus, certaines mutations dans cette boucle engendrent une activation constitutive des récepteurs  $\alpha_{1b}$ -adrénergique (Allen et coll., 1991) et thyrotropique (Parma et coll., 1993) ou au contraire, une malfonction des récepteurs corticotropique (ACTH) (Tsigos et coll., 1993) et  $V_2$  de la vasopressine (van der Ouweland et coll., 1992; Merendino et coll., 1993; Rosenthal et coll., 1992). Ces données supportent l'intérêt d'une étude de l'activité biologique de l'isoforme RPR2c, comportant une insertion de 41 aa dans cette boucle. Enfin, Zeitler et coll. (1998) ont identifié la présence d'une sérine et



d'une thréonine supplémentaire dans l'extrémité C-terminale de l'isoforme GHRH-R $\beta$ . Pour les récepteurs du GHRH (Mayo et coll., 1996, Probst et coll., 1992) et de la sécrétine (Ozcelebi et coll., 1995), membres de la sous-famille B-III, il est connu que ces résidus sont des sites potentiels de phosphorylation. Holtmann et coll. (1996) ont également montré que cette phosphorylation de sérines et de thréonines favorisait la complète désensibilisation, de façon agoniste-dépendante, du récepteur natif de la sécrétine. L'extrémité C-terminale est également susceptible de participer aux réactions intracellulaires suite à l'activation du récepteur (Ferguson et coll., 2001), en plus de favoriser la liaison du ligand (DeAlmeida et coll., 1998). Ainsi la modification de la portion C-terminale dans l'isoforme GHRH-R $\beta$  pourrait engendrer un changement de l'activité biologique observée chez le récepteur natif. De plus, la présence simultanée des trois formes du GHRH-R à la membrane cytoplasmique des cellules somatotrophes pourrait suggérer une modulation de leur sensibilité au GHRH via un mécanisme d'homo et d'hétérodimérisation. Par conséquent, les différentes formes du GHRH-R pourraient être couplées à des voies de signalisation dissemblables, médiant différentes actions du GHRH.

## **5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Cette étude a permis de mettre au point un système d'expression stable de la forme native du rGHRH-R et d'élaborer des stratégies d'expression de ses deux isoformes. Les conditions d'expression de la forme native consistent en un système d'expression inductible par le zinc, le Zem219b, dans la lignée eucaryotique BHK 570 transfectée de façon stable, avec une incubation préalable des cellules de 4h sans sérum, avant leur prélèvement pour l'essai de liaison. Ces conditions d'expression ont été validées en essai de liaison à l'aide du [ $^{125}$ I-Tyr $^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH $_2$  ( $K_d$ ,  $B_{max}$ ) et du [N $^{\alpha}$ -5-carboxyfluoresceinyl-D-Ala $^2$ , Ala $^8$ , Ala $^{15}$ , Lys $^{22}$ ]hGHRH(1-29)NH $_2$ . L'utilisation de ce dernier ligand fluorescent a permis de déterminer la cinétique d'internalisation du récepteur natif, et de proposer une voie d'internalisation pour celui-ci, qui sont similaires à celles du rGHRH-R hypophysaire. La fonctionnalité du rGHRH-R natif étant établie, une étude de structure-affinité avec des analogues Ala- et D-monosubstitués du hGHRH(1-29)NH $_2$  a ensuite permis d'identifier son profil pharmacologique. Ainsi, les résidus Tyr $^1$ , Asp $^3$ , Phe $^6$ , Tyr $^{10}$ , Arg $^{11}$ , Lys $^{12}$ , Leu $^{14}$ , Leu $^{17}$ , Arg $^{20}$  et Lys $^{21}$  se sont révélés impliqués dans la liaison du hGHRH(1-29)NH $_2$  au récepteur natif alors que les résidus Val $^{13}$  et Ala $^{19}$  seraient impliqués dans la liaison et dans le maintien d'une conformation optimale du hGHRH(1-29)NH $_2$  permettant une liaison à haute affinité au rGHRH-R natif. Ces études de structure-affinité auront pour objectif à long terme d'évaluer les modifications moléculaires nécessaires à augmenter l'affinité du récepteur pour le GHRH et en dernier lieu, la conception d'agonistes ou d'antagonistes du GHRH.

L'expression des isoformes du rGHRH-R (RPR2c et GHRH-R $\beta$ ) avec les conditions d'expression utilisées pour la forme native n'ont toutefois pas permis d'obtenir des paramètres d'affinité aussi élevés qu'avec le rGHRH-R natif. Les stratégies exploitées pour l'optimisation de leur expression ont impliqué l'utilisation d'une concentration plus élevée de zinc (20  $\mu$ M au lieu de 3.8  $\mu$ M) pour la culture cellulaire, augmentant le taux de transcription des isoformes et l'utilisation d'homogénat, au lieu de préparations membranaires, pour les essais de liaison. Cette dernière a semblé plus efficace, dans l'obtention de paramètres d'affinité élevée, que l'augmentation de la concentration de zinc. Les étapes subséquentes consisteront à optimiser ainsi qu'à valider les conditions d'expression des isoformes.

Les conditions d'expression des isoformes mises au point, les objectifs à court terme de l'étude seront de les valider en essai de liaison à l'aide du ligand [ $^{125}$ I-Tyr $^{10}$ ]hGHRH(1-44)NH $_2$  en plus d'établir leur profil pharmacologique tel que décrit pour la forme native de 423 aa, suggérant qu'ils pourraient être différents entre eux. Cette hypothèse est basée sur le fait que les domaines spécifiques des isoformes du rGHRH-R ne se retrouvent pas dans la forme native de 423 aa, à savoir l'insertion de 41 aa dans la troisième boucle intracytoplasmique de l'isoforme RPR2c et les modifications en C-terminal de l'isoforme GHRH-R $\beta$ . Ces domaines pourraient donc jouer un rôle important dans l'affinité du ligand pour les isoformes, par rapport à la forme native de 423 aa, en modifiant la structure tridimensionnelle du récepteur.

Subséquentement, l'activité biologique du récepteur natif de 423 aa ainsi que de ses isoformes, par la mesure de la production d'AMPc intracellulaire sera étudiée. Notons qu'il a été démontré que dans l'hypophyse, la voie principale de signalisation intracellulaire du GHRH-R impliquait la stimulation de l'adénylate cyclase (Mayo et coll., 1992; Gaylinn et coll., 1993).

Par ailleurs, les résultats préliminaires obtenus en essai de liaison pour les isoformes du rGHRH-R dans la présente étude pourraient suggérer une contribution dans l'hypophyse comme inhibiteur de l'activité biologique médiée par l'activation du récepteur natif de 423 aa. Rappelons que ce phénomène a été décrit pour les isoformes de la sécrétine et du hGHRH-R (Ding, Cheng et coll., 2002; Ding, Kuntz et coll., 2002; Motomura et coll., 1998). Ainsi, un objectif à long terme de poursuite de cette étude sera la co-transfection de plusieurs formes du rGHRH-R dans les cellules BHK 570. L'analyse du profil de structure-affinité et de structure-activité de ces systèmes répondra à la question de recherche élaborée ci-haut, à savoir que les différences observées entre les profils pharmacologiques du rGHRH-R hypophysaire et du rGHRH-R de 423 aa seraient reliées à la multiplicité des formes du récepteur à la membrane des cellules somatotropes. De plus, de telles études permettraient de définir le rôle physiologique des isoformes du GHRH-R. Enfin, les études de structure-affinité sur la forme native du rGHRH-R et, à moyen terme sur les isoformes permettront d'élaborer des agonistes et/ou agonistes ciblant une ou plusieurs formes du GHRH-R, selon l'implication de ceux-ci dans les situations où la réponse au

GHRH est modifiée.

## **6. BIBLIOGRAPHIE**

AbdAlla, S., Lothar, H., Quitterer, U. 2000. AT1-receptor heterodimers show enhanced G-protein activation and altered receptor sequestration. *Nature* **407** : 94-98.

Abribat, T., Boulanger, L. et Gaudreau, P. 1990. Characterization of [<sup>125</sup>I]-Tyr<sup>10</sup>]human growth hormone-releasing factor(1-44) amide binding to rat pituitary: evidence for high and low affinity classes of sites. *Brain Res.* **528** : 291-299.

Abribat, T., Deslauriers, P., Brazeau, P. et Gaudreau, P. 1991. Alterations of pituitary growth hormone-releasing factor binding sites in aging rats. *Endocrinology* **128** : 633-635.

Adams, E.F., Symowski, H., Buchfelder, M., Poyner, D.R. 2000. A polymorphism in the growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH) receptor gene is associated with elevated response to GHRH by human pituitary somatotrophinomas in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275** : 33-36.

Aguila, M.C. 1994. Growth hormone-releasing factor increases somatostatin release and mRNA levels in the rat periventricular nucleus via nitric oxide by activation of guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91** : 782-786.

Aguila, M.C., McCann, S.M. 1985. The influence of hGRF, CRF, TRH and LH-RH on SRIF release from median eminence fragments. *Brain Res.* **348** : 180-182.

Alaluf, S., Mulvihill, E.R., McIlhinney, R.A. 1995. The metabotropic glutamate receptor mGluR4, but not mGluR1 alpha, is palmitoylated when expressed in BHK cells. *J. Neurochem.* **64** : 1548-1555.

Aleppo, G., Moskal, S.F.N., De Grandis, P.A., Kineman, R.D., Frohman, L.A. 1997. Homologous down-regulation of growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* **138** : 1058-1065.

Allen, L.F., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G., Cotecchia, S. 1991. G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the alpha 1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88** : 11354-11358.

Anborgh, P.H., Dale, L., Seachrist, J., Furgeson, S.S.G. 2000. Differential regulation of b2-adrenergic and angiotensin II type 1A receptor trafficking and resensitization : Role of carboxyl-terminal domains. *Mol. Endocrinol.* **14** : 2040-2053.

Andersen, P., Kedersha, N. 2002. Visibly stressed : the role of eiF-2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones* **7** : 213-221.



Andersen, P.H., Gerlach, L.O., Hansen, B.S., Helmgaard, L., Andreasen, T., Hansen, A., Olsen, O.H., Gaudreau, P., Pedersen, J.T. Pharmacology, functionality, dynamics and structure activity relations of a G proteins-coupled receptor illustrated with the growth hormone releasing hormone (GHRH) receptor and GHRH(1-29)NH<sub>2</sub>. *Dans Peptide and drug delivery*. Eds: Frokjaer, S., Christrup, L., Kroggsgaard-Larsen, P. Copenhagen. 1998. pp 50-60.

Andreasen, T., Helmgaard, L., Gaudreau, P., Anderson, P.H. 1996. Growth hormone-releasing substances. In : *The complexity of endocrines systems*, Ranke, M.B., Christiansen, J.S., Eds, J and J Verlag, Mannheim, pp.1-27

Barinaga, M., Yamamoto, G., Rivier, C., Vale, W., Evans, R., Rosenfeld, M.G. 1983. Transcriptional regulation of growth hormone gene expression by growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor. *Nature* **300**: 276-278.

Baumann, G., Maheshwari, H. 1997. The Dwarfs of Sindh: severe growth hormone (GH) deficiency caused by a mutation in the GH-releasing hormone receptor gene. *Acta Paediatr. Suppl.* **423** : 33-38.

Berry, S.A., Pescovitz, O.H. 1988. Identification of a rat GHRH-like substance and its messenger RNA in rat testis. *Endocrinology* **123** : 661-663.

Berry, S.A., Srivastava, C.H., Rubin, L.R., Phipps, W.R., Pescovitz, O.H. 1992. Growth hormone-releasing hormone-like messenger ribonucleic acid and immunoreactive peptide are present in human testis and placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **75** : 281-284.

Biden, T.J., Prentki, M., Irvine, R.F., Berridge, M.J., Wollheim, C.B. 1984. Inositol 1,4,5-trisphosphate mobilizes intracellular Ca<sup>2+</sup> from permeabilized insulin-secreting cells. *Biochem. J.* **223** : 467-473.

Billestrup, N., Mitchell, R.L., Vale, W., Verma, I.M. 1987. Growth hormone-releasing factor induces c-fos expression in cultured primary pituitary cells. *Mol. Endocrinology* **1** : 300-305.

Blazar, B.R., Brennan, C.A., Broxmeyer, H.E., Shultz, L.D., Valleria, D.A. 1995. Transgenic mice expressing either bovine growth hormone (bGH) or human GH releasing hormone (hGRH) have increasing splenic progenitor cell colony formation and DNA synthesis in vitro and in vivo. *Exp. Hematol.* **23** : 1397-1406.

Bodner, M., Castrillo, J.-L., Theill, L., Deerinck, T., Ellisman, M., Karin, M. 1988. The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. *Cell* **55** : 505-518.

Böhlen, P., Brazeau, P., Block, B., Ling, N., Gaillard, R., Guillemin, R. 1983. Human hypothalamic growth hormone-releasing factor (GRF): evidence for two

forms identical to tumour-derived GRF-44-NH<sub>2</sub> and GRF-40. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **114** : 930-936.

Bohlen, P., Esch, F., Brazeau, P., Ling, N., Guillemin, R. 1983. Isolation and characterization of the porcine growth hormone-releasing factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116** : 726-734.

Boisvert, C., Pare, C., Veyrat-Durebex, C., Robert, A., Dubuisson, S., Morel, G., Gaudreau, P. 2002. Localization and regulation of a functional GHRH receptor in the rat renal medulla. *Endocrinology* **143** : 1475-1484.

Boulanger, L., Andersen, P.H., Gaudreau, P. 1999. Development of a site-directed polyclonal antibody against the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor and its use to estimate GHRH receptor concentration in normal and hypothyroid rats. *Neuroendocrinology* **70** : 117-127.

Boulanger, L., Girard, N., Strecko, J., Gaudreau, P. 2001. Characterization of a growth hormone-releasing factor receptor binding site in the rat renal medulla. *Peptides* **23** : 1187-1194.

Bouvier, M., Hausdorff, W.P., De Blasi, A., O'Dowd, B.F., Kobilka, B.K., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. 1988. Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* **333** : 370-373.

Brazeau, P., Bohlen, P., Esch, F., Ling, N., Wehrenberg, W.B., Guillemin, R. 1984. Growth hormone-releasing factor from ovine and caprine hypothalamus: isolation, sequence analysis and total synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **125** : 606-614.

Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R. 1973. Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* **170** : 77-79.

Brezis, M., Rosen, S. 1995. Hypoxia of the renal medulla: its implications for disease. *N. Engl. J. Med.* **332** : 647-655.

Busto, R., Schally, A.V., Varga, J.L., Garcia-Fernandez, M.O., Groot, K., Armatis, P., Szepeshazi, K. 2002. The expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and splice variants of its receptor in human gastroenteropancreatic carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99** : 11866-11871.

Campbell, R.M., Lee, Y., Rivier, J., Heimer, E.P., Felix, A.M., Mowles, T.F. 1991. GRF analogs and fragments: correlation between receptor binding, activity and structure. *Peptides* **12** : 569-574.

Ceda, G., Valenti, G., Butterini, U., Hoffman, A.R. 1986. Diminishing pituitary response to growth hormone-releasing factor in aging male rats. *Endocrinology* **118** : 2109-2114.

Chakraborty, C., Katsumata, N., Myal, Y., Schroedter, I.C., Brazeau, P., Murphy, L.J., Shiu, R.P.C., Friesen, H.G. 1995. Age-related changes in peptide-23/pancreatitis-associated protein and pancreatic stone protein/reg gene expression in the rat and regulation by growth hormone-releasing hormone. *Endocrinology* **136** : 1843-1849.

Chang, R.C., Suen, K.C., Ma, C.H., Alyaman, W., Ng, H.K., Hugon, J. 2002. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and phosphorylation of eucaryotic initiation factor-2alpha in neuronal degeneration. *J. Neurochem.* **83** : 1215-1225.

Chen, C., Xu, R., Clarke, I.J., Ruan, M., Loneragan, K., Roh, S.G. 2000. Diverse intracellular signalling systems used by growth hormone-releasing hormone in regulating voltage-gated Ca<sup>2+</sup> or K channels in pituitary somatotropes. *Immunol. Cell. Biol.* **78** : 356-368.

Chen, R., Lewis, K.A., Perrin, M.H., Vale, W.W. 1993. Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90** : 8967-8971.

Ciampani, T., Fabbri, A., Isidori, A., Dufau, M.L. 1992. Growth hormone-releasing hormone is produced by rat Leydig cell in culture and acts as a positive regulator of Leydig cell function. *Endocrinology* **131** : 2785-2792.

Cohick, W.S., Clemmons, D.R. 1993. The insulin-like growth factors. *Annu. Rev. Physiol.* **14**, 20-39.

Corpas, E., Harman, M., Blackman, M.R. 1993. Human growth hormone and human aging. *Endocrinol. Rev.* **14** : 20-39.

Coy, D.H., Murphy, W.B., Sueiras-Diaz, J., Coy, E.J., Lance, V.A. 1985. Structure-activity studies on the N-terminal region of growth hormone releasing factor. *J. Med. Chem.* **28** : 181-185.

Cronin, M.J., Canonico, P.L. 1985. Tumor promoters enhance basal and growth hormone releasing factor stimulated cyclic AMP levels in anterior pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129** : 404-410.

Cronin, M.J., Summers, S.T., Sortino, M.A., Hewlett, E.L. 1986. Protein kinase C enhances growth hormone releasing factor (1-40)-stimulated cyclic AMP levels in anterior pituitary. *J. Biol. Chem.* **261** : 13932-13935.

Cunha, S.R., Mayo, K.E. 2002. Ghrelin and growth hormone (GH) secretagogues potentiate GH-releasing hormone (GHRH)-induced cyclic adenosine 3',5'-monophosphate production in cells expressing transfected GHRH and GH secretagogue receptors. *Endocrinology* **143** : 4570-4582.

Cuttler, L., Glaum, S.R., Collins, B.A., Miller, R.J. 1992. Calcium signalling in single growth hormone-releasing factor-responsive pituitary cells. *Endocrinology* **130** : 945-953.

DeAlmeida, V.I., Mayo, K.E. 1998. Identification of binding domains of the growth hormone-releasing hormone receptor by analysis of mutant and chimeric receptor proteins. *Mol. Endocrinol.* **12** : 750-765.

Dean, C.E., Porter, T.E. 1999. Regulation of somatotroph differentiation and growth hormone (GH) secretion by corticosterone and GH-releasing hormone during embryonic development. *Endocrinology* **140** : 1104-1110.

Delporte, C., Poloczek, P., Neef, P., Vertongen, P., Ciccarelli, E., Svoboda, M., Herchuelz, A., Winand, J., Robberecht, P. 1995. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and vasoactive intestinal peptide stimulate two signaling pathways in CHO cells stably transfected with the selective type I PACAP receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* **107** : 71-76.

D'Ercole, A.J., Stiles, A.D., Underwood, L.E. 1984. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81** : 935-939.

D'Ercole, A.J., Hill, D.J., Strain, A.J., Underwood, L.E. 1986. Tissue and plasma somatomedin-C/insulin-like growth factor I concentrations in the human fetus during the first half of gestation. *Pediatr Res* **20** : 253-255.

Deslauriers, N., Gaudreau, P., Abribat, T., Renier, G., Petitclerc, D., Brazeau, P. 1991. Dynamics of growth hormone responsiveness to growth hormone-releasing factor in aging rats: peripheral and central influences. *Neuroendocrinology* **53** : 439-446.

Dessy, C., Kelly, R.A., Balligand, J.L., Feron, O. 2000. Dynamin mediates caveolar sequestration of muscarinic cholinergic receptors and alteration in NO signaling. *E.M.B.O. J.* **19** : 4272-4280.

Ding, W.-Q., Cheng, Z.-J., McElhiney, J., Kuntz, S.M., Miller, L.J. 2002. Silencing of secreting receptor function by dimerization with a misspliced variant secretin receptor in ductal pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Research* **62** : 5223-5229.

Ding, W.Q., Kuntz, S., Bohmig, M., Wiedenmann, B., Miller, L.J. 2002. Dominant

negative action of an abnormal secretin receptor arising from mRNA missplicing in a gastrinoma. *Gastroenterology* **122** : 500-511.

Du, K., Nicole, P., Couvineau, A., Laburthe, M. 1997. Aspartate 196 in the first extracellular loop of the human VIP1 receptor is essential for VIP binding and VIP-stimulated cAMP production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230** : 289-292.

Eason, M.G., Jacinto, M.T., Theiss, C.T., Liggett, S.B. 1994. The palmitoylated cysteine of the cytoplasmic tail of alpha 2A-adrenergic receptors confers subtype-specific agonist-promoted downregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91** :11178-11182.

Esch, F., Bohlen, P., Ling, N., Brazeau, P., Guillemin, R. 1983. Isolation and characterization of bovine hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117** : 772-779.

Fabbri, A., Ciocca, D.R., Ciampani, T., Wang, J., Dufau, M.L. 1995. Growth hormone-releasing hormone in testicular interstitial and germ cells: potential paracrine modulation of follicle-stimulating hormone action on Sertoli cell function. *Endocrinology* **136** : 2303-2308.

Farrell, P.J., Balkow, K., Hunt, T., Jackson, R.J., Trachsel, H. 1977. Phosphorylation of initiation factor eIF-2 and the control of reticulocyte protein synthesis. *Cell* **11** : 187-200.

Ferguson, S.S.G. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol. Rev.* **53**: 1-24.

Finkelstein, J., Roffwarg, H., Boyar, R., Kream, J., Hellman, L. 1972. Age-related changes in the twenty-four hour spontaneous secretion of growth hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **33** : 165-176.

French, M.B., Moore, B.C., Lussier, B.T., Kraicer, J. 1989. Protein kinase C is not essential for growth hormone (GH)-releasing factor-induced GH release from rat somatotrophs. *Endocrinology* **124** : 2235-2244.

Frohman, M.A., Downs, T.R., Chomczynski, P., Frohman, L.A. 1989. Cloning and characterization of mouse growth hormone-releasing hormone (GRH) complementary DNA: increased GRH messenger RNA levels in the growth hormone-deficient *lit/lit* mouse. *Mol. Endocrinol.* **3** : 1529-1536.

Fujinaka Y, Yokogoshi Y, Zhang CY, Okura T, Kitagawa K, Saito S. 1996 Tissue-specific molecular heterogeneity of human growth hormone-releasing hormone receptor protein. *F.E.B.S. Lett.* **394** : 1-4.

Gaudreau, P., Boulanger, L., Abribat, T. 1992. Affinity of human growth hormone-releasing factor (1-29)NH<sub>2</sub> analogues for GRF binding sites in rat adenopituitary. *J. Med. Chem.* **35** : 1864-1869.

Gaudreau, P., Boulanger, L., Morel, G. 1999. Axe somatotrope et vieillissement: importance du récepteur hypophysaire du facteur de libération de l'hormone de croissance. *Méd Sci* **15** : VII-IX.

Gaylinn, B.D., Harrison, J.K., Zysk, J.R., Lyons, C.E., Lynch, K.R., Thorner, M.O. 1993. Molecular cloning and expression of a human anterior pituitary receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol. Endocrinol.* **7** : 77-84.

Gaylinn, B.D., Lyons, C.E., Zysk, J.R., Clarke, I.J., Thorner, M.J. 1994. Photoaffinity cross-linking to pituitary receptor for growth hormone-releasing factor. *Endocrinology* **135** : 950-955.

Gaylinn, B.D., von Kap-Herr, C., Golden, W.L., Thorner, M.O. 1994. Assignment Girard, N., Boulanger, L., Denis, S., Gaudreau, P. 1999. Differential *in vivo* regulation of the pituitary growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor by GHRH in young and aged rats. *Endocrinology* **140** : 2836-2842.

Giros, B., Sokoloff, P., Martres, M.P., Riou, J.F., Emorine, L.J., Schwartz, J.C. 1989. Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms. *Nature* **342** : 923-926.

Glavaski-Joksimovic, A., Jeftinija, K., Jeremic, A., Anderson, L.L., Jeftinija, S. 2002. Mechanism of action of the growth hormone secretagogue, L-692,585, on isolated porcine somatotropes. *J. Endocrinol.* **175** : 625-636.

Godfrey, P.G., Rahal, J.O., Beamer, W.G., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Mayo, K.E. 1993. GHRH receptor of *little* mice contains a missense mutation in the extracellular domain that disrupts receptor function. *Nature Genet.* **4** : 227-232.

Godovac-Zimmermann, J., Soskic, V., Poznanovic, S., Brianza, F. 1999. Functional proteomics of signal transduction by membrane receptors. *Electrophoresis* **20** : 952-961.

Gonzalez, G.A., Montminy, M.R. 1989. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* **59** : 675-689.

Gordeladze, J.O., Bjoro, T., Torjesen, P.A., Ostberg, B.C., Haug, E., Gautvik, K.M. 1989. Protein kinase C stimulates adenylate cyclase activity in prolactin-secreting rat adenoma (GH4C1) pituicytes by inactivating the inhibitory GTP-binding protein G<sub>i</sub>. *Eur. J. Biochem.* **183** : 397-406.

Gouldson, P.R., Higgs, C., Smith, R.E., Dean, M.K., Gkoutos, G.V., Reynolds, C.A. 2000. Dimerization and domain swapping in G-protein-coupled receptors: a computational study. *Neuropsychopharmacology* **23** : S60-S77.

Grewal, S.S., Fass, D.M., Yao, H., Ellig, C.L., Goodman, R.H., Stork, P.J. 2000. Calcium and cAMP signals differentially regulate cAMP-responsive element-binding protein function via a Rap1-extracellular signal-regulated kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **275** : 34433-34441.

Groskreutz, D., Schenborn, E. 1994. Increased gene expression in mammalian cell lines using pAdVantage™ DNA as a co-transfectant. *Promega Notes* **48** : 8.

Guarcello, V., Weigent, D.A., Blalock, J.E. 1991. Growth hormone-releasing hormone receptors on thymocytes and splenocytes from rats. *Cell. Immunol.* **136** : 291-302.

Guillemin, R., Brazeau, P., Böhlen, P., Esch, F., Ling, N., Wehrenberg, W.B. 1982. Growth hormone-releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly. *Science* **218** : 558-587.

Haasemann, M., Cartaud, J., Muller-Esterl, W., Dunia, I. 1998. Agonist-induced redistribution of bradykinin B2 receptor in caveolae. *J. Cell. Sci.* **111** :917-928.

Han, A.P., Yu, C., Lu, L., Fujiwara, Y., Browne, C., Chin, G., Fleming, M., Leboulch, P., Orkin, S.H., Chen, J.J. 2001. Heme-regulated eIF2alpha kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *E.M.B.O.* **20** : 6909-6918.

Hashimoto, H., Ogawa, N., Hagihara, N., Yamamoto, K., Imanishi, K., Nogi, H., Nishino, A., Fujita, T., Matsuda, T., Nagata, S., Baba, A. 1997. Vasoactive intestinal polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor chimeras reveal domains that determine specificity of vasoactive intestinal polypeptide binding and activation. *Mol. Pharmacol.* **52** : 128-135.

Hashimoto, K., Koga, M., Motomura, T., Kasayama, S., Kouhara, H., Ohnishi, T., Arita, N., Hayakawa, T., Sato, B., Kishimoto, T. 1995. Identification of alternatively spliced messenger ribonucleic acid encoding truncated growth hormone-releasing hormone receptor in human pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80** : 2933-2939.

Hassan, H.A., Biological activities of two porcine growth hormone-releasing hormone receptor isoforms. *Arch. Biochem. Biophys.* **387** : 20-26.

Hassan, H.A., Hsiung, H.M., Zhang, X.Y., Smith, D.P., Smiley, D.L., Heiman, M.L. 1995. Characterization of growth hormone-releasing hormone (GHRH) binding to cloned porcine GHRH receptor. *Peptides* **16** :1469-1473.

Hayashida, C.Y., Gondo, R.G., Ferrari, C., Toledo, S.P., Salvatori, R., Levine, M.A., Ezabella, M.C., Abelin, N., Gianella-Neto, D., Wajchenberg, B.L. 2000. Familial growth hormone deficiency with mutated GHRH receptor gene: clinical and hormonal findings in homozygous and heterozygous individuals from Itabaianinha. *Eur. J. Endocrinol.* **142** : 557-563.

Hébert, T., Bouvier M. 1998. Structural and functional aspects of G protein-coupled receptor oligomerization. *Biochem. Cell Biol.* **76**: 1-11.

Ho, K.J., Evans, W.S., Blizzard, R.M., Velhuis, J.D., Merriam, G.R., Samojlik, E., Furlanetto, R., Rogol, A.D., Kaiser, D.L., Thorner, M.D. 1987. Effects of sex and age on the 24-h profile of growth hormone secretion in man: importance of endogenous estradiol concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* **64** : 51-58.

Holtmann, M.H., Ganguli, S., Hadac, E.M., Dolu, V., Miller, L.J. 1996. Multiple extracellular loop domains contribute critical determinants for agonist binding and activation of the secretin receptor. *J. Biol. Chem.* **271** : 14944-14949.

Holtmann, M.H., Roettger, B.F., Pinon, D.I., Miller, L.J. 1996. Role of receptor phosphorylation in desensitization and internalisation of the secretin receptor. *J. Biol. Chem* **271** : 23566-23571.

Horikawa, R., Gaylinn, B.D., Lyons Jr, C.E., Thorner, M.O. 2001. Molecular cloning of ovine and bovine growth hormone-releasing hormone receptors: the ovine receptor is C-terminally truncated. *Endocrinology* **142** : 2660-2668.

Horikawa, R., Hellmann, P., Cella, S.G., Torsello, A., Day, R.N., Muller, E.E., Thorner, M.O. 1996. Growth hormone-releasing factor (GRF) regulates expression of its own receptor. *Endocrinology* **137** : 2642-2645.

Hsiung, H.M., Smith, D.P., Zhang, X.Y., Bennet, T., Rosteck, P.R., Lai, M.H. 1993. Structure and functional expression of a complementary DNA for porcine growth hormone-releasing hormone receptor. *Neuropeptides* **25** : 1-10.

Iguchi, G., Okimura, Y., Takahashi, T., Mizuno, I., Fumoto, M., Takahashi, Y., Kaji, H., Abe, H., Chihara, K. 1999. Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. *J. Biol. Chem.* **274** : 12108-12114.

Ingraham, H., Chen, R., Mangalam, H., Elsholtz, H., Flynn, S., Lin, C., Simmons, D., Swanson, L., Rosenfeld, M. 1988. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* **55** : 519-529.



Isgaard, J., Moller, C., Isaksson, O.G., Nilsson, A., Mathews, L.S., Norstedt, G. 1988. Regulation of insulin-like growth factor messenger ribonucleic acid in rat growth plate by growth hormone. *Endocrinology* **122** : 1515-1520.

Ishihara, T., Nakamura, S., Toro, Y., Takahashi, T., Takahashi, K., Nagata, S. 1991. Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the secretin receptor. *E.M.B.O. J.* **10** :1635-1641.

Ishihara, T., Shigemoto, R., Mori, K., Takahashi, K., Nagata, S. 1992. Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *Neuron* **8** : 811-819.

Jelinek, L., Lok, S., Rosenberg, G.B., Smith, R.A., Grant, F.J., Biggs, S., Bensch, P.A., Kuijter, J.L., Sheppard, P.O., Sprecher, C.A., O'Hara, P.J., Foster, D., Walker, M., Chen, L.H.J., McKernan, P.A., Kindsvogel, W. 1993. Expression cloning and signaling properties of the rat glucagon receptor. *Science* **259** : 1614-1616.

Jin, H., Xie, Z., George, S.R., O'Dowd, B.F. 1999. Palmitoylation occurs at cysteine 347 and cysteine 351 of the dopamine D(1) receptor. *Eur. J. Pharmacol.* **386** : 305-312.

Jordan, B.A., Devi, L.A. 1999. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* **399** : 697-700.

Judd, A.M., Koike, K., Yasumoto, T., MacLeod, R.M. 1986. Protein kinase C activators and calcium-mobilizing agents synergistically increase GH, LH, and TSH secretion from anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* **42** : 197-202.

Kamegai, J., Unterman, T.G., Frohman, L.A., Kineman, R.D. 1998. Hypothalamic/pituitary-axis of the spontaneous dwarf rat: autocrine/paracrine regulation of growth hormone (GH) includes suppression of GH releasing-hormone receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology*. **139** : 3554-3560.

Kato, M., Hoyland, J., Sikdar, S.K., Mason, W.T. 1992. Imaging of intracellular calcium in rat anterior pituitary cells in response to growth hormone-releasing hormone factor. *J. Physiol.* **447** : 171-189.

Kawate, N., Menon, K.M. 1994. Palmitoylation of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in transfected cells. Abolition of palmitoylation by mutation of Cys-621 and Cys-622 residues in the cytoplasmic tail increases ligand-induced internalization of the receptor. *J. Biol. Chem.* **269** : 30651-30658.

Kishimoto, M., Okimura, Y., Yagita, K., Iguchi, G., Fumoto, M., Iida, K., Kaji, H., Okamura, H., Chihara, K. 2002. Novel function of the transactivation domain of a pituitary-specific transcription factor, Pit-1. *J. Biol. Chem.* **277** : 45141-45148.

Kitajewski, J., Schneider, R.J., Safer, B., Munemitsu, S.M., Samuel, C.E., Thimmappaya, B., Shenk, T. 1986. Adenovirus VAI RNA antagonizes the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon-induced eIF-2 alpha kinase. *Cell* **45** : 195-200.

Kleijn, M., Proud, C.G. 2000. The activation of eucaryotic initiation factor (IF)2B by growth factors in PC12 cells requires MEK/ERK signalling. *F.E.B.S. Letters* **476** : 262-265.

Klemm, D.J., Leitner, J.W., Watson, P., Nesterova, A., Reusch, J.E., Goalstone, M.L., Draznin, B. 2001. Insulin-induced adipocyte differentiation. Activation of CREB rescues adipogenesis from the arrest caused by inhibition of prenylation. *J. Biol. Chem.* **276** : 28430-28435.

Kobilka, B.K., MacGregor, C., Daniel, K., Kobilka, T.S., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. 1987. Functional activity and regulation of human beta 2-adrenergic receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **262** : 15796-15802.

Koch, B.D., Blalock, J.B., Schonbrunn, A. 1988. Characterization of the cyclic AMP-independent actions of somatostatin in GH cells. I. An increase in potassium conductance is responsible for both the hyperpolarisation and the decrease in intracellular free calcium produced by somatostatin. *J. Biol. Chem.* **263** : 216-225.

Kolakowski, L.F., Zhuang, J. 1997. G protein-coupled receptor family B. *Dans* The G protein-coupled receptor database, World-Wide-Web site. URL : <http://www.gcrdb.uthscsa.edu/FBintro.html>

Konturek, S.J., Brzozowski, T., Dembinski, A., Warzecha, Z., Konturek, P.K., Yanaihara, N. 1988. Interaction of growth hormone-releasing factor and somatostatine on ulcer healing and mucosal growth in rats: role of gastrin and epidermal growth factor. *Digestion* **41** : 121-128.

Korytko, A., Zeitler, P., Cuttler, L. 1996. Developmental regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression in the rat. *Endocrinology* **137** : 1326-1331.

Korytko, A.I., Cuttler, L. 1997. Thyroid hormone and glucocorticoid regulation of pituitary growth hormone-releasing hormone receptor gene expression. *J. Endocrinol.* **152** : R13-R17.

Kovacs, M., Schally, A.V., Lee, E.J., Busto, R., Armatis, P., Groot, K., Varga, J.L. 2002. Inhibitory effects of antagonistic analogs of GHRH on GH3 pituitary cells overexpressing the human GHRH receptor. *J. Endocrinol.* **175** : 425-434.

Kubiak, T.M., Friedman, R., Moseley, W., 1996. Synthetic analogues of growth hormone releasing factor (GHRF) with improved pharmaceutical properties. *Dans Growth hormone secretagogues*. Bercu BB et Walker RF, Eds. Springer-Verlag, New York. pp 33-47.

Laburthe, M., Couvineau, A., Gaudin, P., Maoret, J.J., Rouyer-Fessard, C., Nicole, P. 1996. Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **805** : 94-111

Laburthe, M., Couvineau, A., Gaudin, P., Maoret, J.J., Rouyer-Fessard, C., Nicole, P. 1996. Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **805** : 94-111

Lam, K.S.L., Lee, M.F., Tam, S.P., Srivastava, G. 1996. Gene expression of the receptor for growth-hormone-releasing hormone is physiologically regulated by glucocorticoids and estrogen. *Neuroendocrinology* **63** : 475-480.

Lang, I., Schernthaner, G., Pietschmann, P., Kurz, R., Stephenson, J.M., Temple, H. 1987. Effects of sex and age on growth hormone response to growth hormone-releasing hormone in healthy individuals. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **65** : 535-540.

Lasko, C.M., Korytko, A.I., Wehrenberg, W.B., Cuttler, L. 2001. Differential GH-releasing hormone regulation of GHRH receptor mRNA expression in the rat pituitary. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **280** : E626-E631.

Lazennec, G., Thomas, J.A., Katzenellenbogen, B.S. 2001. Involvement of cyclic AMP response element binding protein (CREB) and estrogen receptor phosphorylation in the synergistic activation of the estrogen receptor by estradiol and protein kinase activators. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **77** : 193-203.

Lee, E.J., Duan, W.R., Kotlar, T., Jameson, J.L. 2001. Restoration of growth hormone-releasing hormone (GHRH) responsiveness in pituitary GH3 cells by adenovirus-directed expression of the human GHRH receptor. *Endocrinology* **142**: 414-420.

Lefrançois, L., Boulanger, L., Gaudreau, P. 1995. Effects of aging on pituitary growth hormone-releasing factor receptor binding sites: *in vitro* mimicry by guanyl nucleotides and reducing agents. *Brain Res.* **673** : 39-46.

Lefrançois, L., Gaudreau, P. 1994. Identification of receptor-binding pharmacophores of growth hormone-releasing factor in rat adenopituitary. *Neuroendocrinology* **59** : 363-370.

Lin, C., Lin, S.C., Chang, C.P., Rosenfeld, M.G. 1992. Pit-1 dependent expression of the receptor for growth hormone-releasing factor mediates pituitary cell growth. *Nature* **360** : 765-768.

Lin, S-C., Lin, C.R., Gukovsky, I., Lusic, A.J., Sawchenko, P.E., Rosenfeld, M.G. 1993. Molecular basis of the *little* mouse phenotype and implication for cell type-specific growth. *Nature* **364** : 208-213.

Ling, N., Baird, A., Wehrenberg, W.B., Munegumi, T., Ueno, N. Synthetic GRF analogs as competitive antagonists of GRF. Therapeutic agents produced by genetic engineering, "Quo Vadis?". Symposium; Medsi: Parism France, 1985 pp 309-322.

Ling, N., Brazeau, P. 1983. Structure activity relationship in the molecule of hpGRF, growth hormone-releasing factor. *Endocrinology* **112** : A295.

Ling, N., Esch, F., Böhlen, P., Brazeau, P., Wehrenberg, W.B., Guillemin, R. 1984. Isolation, primary structure and synthesis of human hypothalamic somatocrinin: growth hormone-releasing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 4302-4307.

Lobie, P.E., Sadir, R., Graichen, R., Mertani, H.C., Morel, G. 1999. Caveolar internalization of growth hormone. *Exp. Cell. Res.* **246** : 47-55.

Lumpkin, M.D., McDonald, J.K. 1989. Blockade of growth hormone-releasing factor (GRF) activity in the pituitary and hypothalamus of the conscious rat with a peptidic GRF antagonist. *Endocrinology* **124** : 1522-1531.

Lussier, B.T., French, M.B., Moore, B.C., Kraicer, J. 1991. Free intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and growth hormone (GH) release from purified rat somatotrophs. III. Mechanism of action of GH-releasing factor and somatostatin. *Endocrinology* **128** : 592-603.

Maheshwari, H.G., Silvermann, B.L., Dupuis, J., Baumann, G. 1998. Phenotype and genetic analysis of a syndrome caused by an inactivating mutation in the growth hormone-releasing hormone receptor: Dwarfism of Sindh. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83** : 4065-4074.

Martinoli, M.3G., Ouellet, J., Rheume, E., Pelletier, G. 1991. Growth-hormone and somatostatin gene expression in adult and aging rats as measured by quantitative in situ hybridization. *Neuroendocrinology* **54** : 607-615.

Matsubara, S., Sato, M., Mizobuchi, M., Niimi, M., Takahara, J. 1995. Differential gene expression of growth hormone (GH)-releasing hormone (GRH) and GRH receptor in various rat tissues. *Endocrinology* **136** : 4147-4150.

Mayo, K.E. 1992. Molecular cloning and expression of a pituitary-specific receptor for growth hormone-releasing hormone. *Mol. Endocrinol.* **6** : 1734-1744.

Mayo, K.E., Cerelli, G.M., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M. 1985. Characterization of cDNA and genomic clones encoding the precursor to rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature* **314** : 464-467.

Mayo, K.E., Godfrey, P.A., Suhr, S.T., Kulik, D.J., Rahal, J.O. 1995. Growth hormone-releasing hormone: synthesis and signaling. *Recent Prog. Horm. Res.* **50** : 35-73.

Mayo, K.E., Hammer, R.E., Swanson, D.W., Brinster, R.L., Rosenfeld, M.G., Evans, R.M. 1988. Dramatic pituitary hyperplasia in transgenic mice expressing a human growth hormone-releasing factor gene. *Mol. Endocrinol.* **2**: 606-612.

Mayo, K.E., Miller, T.L., DeAlmeida, V., Zheng, J., Godfrey, P.A. 1996. The growth-hormone-releasing hormone receptor: signal transduction, gene expression, and physiological function in growth regulation. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **805** : 184-203.

McCormick, A., Brady, H., Theill, L.E., Karin, M. 1990. Regulation of the pituitary-specific homeobox gene GHF1 by cell-autonomous and environmental cues. *Nature* **345** : 829-832.

Meier, J.L., Stinski, M.F. 1996. Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *Intervirology* **39** : 331-342.

Merendino, J.J. Jr., Spiegel, A.M., Crawford, J.D., O'Carroll, A.M., Brownstein, M.J., Lolait, S.J. 1993. Brief report: a mutation in the vasopressin V2-receptor gene in a kindred with X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *N. Engl. J. Med.* **328** : 1538-1541.

Miki, N., Ono, M., Murata, Y., Ohsaki, E., Tamitsu, K., Ri, T., Demura, H., Yamada, M. 1995. Thyroid hormone regulation of gene expression of the pituitary growth hormone-releasing factor receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217** : 1087-1093.

Miller, T.L., Godfrey, P.A., DeAlmeida, V.I., Mayo, K.E. 1999. The rat growth hormone-releasing hormone receptor gene: structure, regulation, and generation of receptor isoforms with different signaling properties. *Endocrinology* **140** : 4152-4165.

Miller, T.L., Mayo, K.E. 1997. Glucocorticoids regulate pituitary growth hormone-releasing hormone receptor messenger riconucleic acid expression. *Endocrinology* **138** : 2458-2465.

Moench, S.J., Moreland, J., Stewart, D.H., Dewey, T.G. 1994. Fluorescence studies of the location and membrane accessibility of the palmitoylation sites of rhodopsin. *Biochemistry* **33** : 5791-5796.

Moffett, S., Adam, L., Bonin, H., Loisel, T.P., Bouvier, M., Mouillac, B. 1996. Palmitoylated cysteine 341 modulates phosphorylation of the beta2-adrenergic receptor by the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **271** : 21490-21497.

Moffett, S., Mouillac, B., Bonin, H., Bouvier, M. 1993. Altered phosphorylation and desensitization patterns of a human beta 2-adrenergic receptor lacking the palmitoylated Cys341. *E.M.B.O. J.* **12** : 349-356.

Momany, F.A., Bowers, C.Y. 1996. Speculations on the mechanism of hormone-receptor interactions of the secretin/glucagon family of polypeptide hormones derived from computational structural studies. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **805** : 172-183.

Montmayeur, J.P., Guiramand, J., Borrelli, E. 1993. Preferential coupling between dopamine D2 receptors and G-proteins. *Mol. Endocrinol.* **7** : 161-170.

Morel, G., Gallego, R., Boulanger, L., Pintos, E., Garcia-Caballero, T., Gaudreau, P. 1999. Restricted presence of the growth hormone-releasing hormone receptor to somatotropes in rat and human pituitaries. *Neuroendocrinology* **70** : 128-136.

Moretti, C., Bagnato, A., Solan, N., Frajese, G., Catt, K.J. 1990. Receptor-mediated actions of growth hormone releasing factor on granulosa cell differentiation. *Endocrinology* **127** : 2117-2126.

Moretti, C., Fabbri, A., Gnessi, L., Bonifacio, V., Bolotti, M., Arizzi, M., Nazziocone, Q., Spera, G. 1989. Reproductive medicine : Medical Therapy. *Dans* : Elsevier Science Publishers. Frajese, G., Steinberg, E., Rodriguez-Rigau, L.J., Eds. New York. pp 103-112.

Motomura, T., Hashimoto, K., Koga, M., Arita, N., Hayakawa, T., Kishimoto, T., Kasayama, S. 1998. Inhibition of signal transduction by a splice variant of the growth hormone-releasing hormone receptor expressed in human pituitary adenomas. *Metabolism* **47** : 804-808.

Murthy, K.S., Makhoul, G.M. 2000. Heterologous desensitization mediated by G protein-specific binding to caveolin. *J. Biol. Chem.* **275**: 30211-30219.

Nilson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O.G., Lindahl, A., Isgaard, J. 1994. Hormonal regulation of longitudinal bone growth. *Eur. J. Clin. Nutr.* **48**, 150-160

Nogami H, Matsubara M, Harigaya T, Katayama M, Kawamura K. 2000. Retinoic acids and thyroid hormone act synergistically with dexamethasone to increase growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression. *Endocrinologie* **141** :4396-4401.

Nogami H., Hiraoka, Y., Matsubara, M., Nonobe, E., Harigaya, T., Katayama, M., Hemmi, N., Kobayashi, S., Mogi, K., Aiso, S., Kawamura, K., Hisano, S. A composite hormone response element regulates transcription of the rat GHRH receptor gene. *Endocrinology* **143** : 1318-1326.

Obal Jr, F., Payne, L., Kapas, L., Opp, M., Krueger, J.M. 1991. Inhibition of growth hormone-releasing factor suppresses both sleep and growth hormone secretion in the rat. *Brain Res.* **557** : 149-153.

Obal, F. Jr, Fang, J., Taishi, P., Kacsoh, B., Gardi, J., Krueger, J.M. 2001. Deficiency of growth hormone-releasing hormone signaling is associated with sleep alterations in the dwarf rat. *J. Neurosci.* **21** : 2912-2918.

O'Dowd, B.F., Hnatowich, M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Bouvier, M. 1989. Palmitoylation of the human beta 2-adrenergic receptor. Mutation of Cys341 in the carboxyl tail leads to an uncoupled nonpalmitoylated form of the receptor. *J. Biol. Chem.* **264** : 7564-7569.

Ohmura, E., Friesen, H.G. 1985. 12-O-Tetradecanoyl phorbol-13-acetate stimulates rat growth hormone (GH) release through different pathways from that of human pancreatic GH-releasing factor. *Endocrinology* **116** : 728-737.

Okamoto, T., Schlegel, A., Scherer, P.E., Lisanti, M.P. 1998. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **273** : 5419-5422.

Okamoto, Y., Ninomiya, H., Tanioka, M., Sakamoto, A., Miwa, S., Masaki, T. 1997. Palmitoylation of human endothelinB. Its critical role in G protein coupling and a differential requirement for the cytoplasmic tail by G protein subtypes. *J. Biol. Chem.* **272** : 21589-21596.

Oksche, A., Boese, G., Horstmeyer, A., Furkert, J., Beyermann, M., Bienert, M., Rosenthal, W. 2000. Late endosomal/lysosomal targeting and lack of recycling of the ligand-occupied endothelin B receptor. *Mol. Pharmacol.* **57** : 1104-1113.

O'Malley, R.P., Mariano, T.M., Siekierka, J., Mathews, M.B. 1986. A mechanism for the control of protein synthesis by adenovirus VA RNAI. *Cell* **44** : 391-400.

Ono, M., Miki, N., Murata, Y., Osaki, E., Tamitsu, K., Ri, T., Yamada, M., Demura, H. 1995. Sexually dimorphic expression of pituitary growth hormone-

releasing factor receptor in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216** : 1060-1066.

Ostrom, R.S., Gregorian, C., Drenan, R.M., Xiang, Y., Regan, J.W., Insel, P.A. 2001. Receptor number and caveolar co-localization determine receptor coupling efficiency to adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **276** : 42063-42069.

Ovchinnikov, Yu.A., Abdulaev, N.G., Bogachuk, A.S. 1988. Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated. *F.E.B.S. Lett.* **230** : 1-5.

Ozcelebi, F., Holtmann, M.H., Rentsch, R.U., Rao, R., Miller, L.J. 1995. Agonist-stimulated phosphorylation of the carboxyl-terminal tail of the secretin receptor. *Mol. Pharmacol.* **48** : 818-24

Pak, Y., O'Dowd, B.F., Wang, J.B., George, S.R. 1999. Agonist-induced, G protein-dependent and -independent down-regulation of the mu opioid receptor. The receptor is a direct substrate for protein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **274** : 27610-27616.

Palmiter, R.D. 1994. Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91** : 1219-1223.

Pap, M., Cooper, G.M. 2002. Role of translation initiation factor 2B in control of cell survival by the phosphatidylinositol 3 kinase/AKT/glycogen synthase kinase 3 $\beta$  signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* **22** : 578-586.

Parma, J., Duprez, L., Van Sande, J., Cochaux, P., Gervy, C., Mockel, J., Dumont, J., Vassart, G. 1993. Somatic mutations in the thyrotropin receptor gene cause hyperfunctioning thyroid adenomas. *Nature* **365** : 649-651.

Pathak, V.K., Schindler, D., Hershey, J.W. 1988. Generation of a mutant form of protein synthesis initiation factor eIF-2 lacking the site of phosphorylation by eIF-2 kinases. *Mol. Cell. Biol.* **8** : 993-995.

Pescovitz, O.H., Berry, S.A., Laudon, M., Ben Jonathan, N., Martin-Myers, A., Hsu, S.M., Lambros, T.J., Felix, A.M. 1990. Localization and growth hormone (GH)-releasing activity of rat testicular GH-releasing hormone-like peptide. *Endocrinology* **127** : 2336-2342.

Peter, M.A., Winterhalter, K.H., Boni-Schnetzler, M., Froesch, E.R., Zapf, J. 1993. Regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins by growth hormone in rat white adipose tissue. *Endocrinology* **133** : 2624-2631.



Petersenn, S., Rasch, A.C., Heyens, M., Schulte, H.M. 1998. Structure and regulation of the human growth hormone-releasing hormone receptor gene. *Mol. Endocrinol.* **12** : 233-247.

Petersenn, S., Schulte, H.M. 2000. Structure and function of the growth-hormone-releasing hormone receptor. *Vitam. Horm.* **59** : 35-69.

Pickering, D.S., Taverna, F.A., Salter, M.W., Hampson, D.R. 1995. Palmitoylation of the GluR6 kainate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92** : 12090-12094.

Pisegna, J.R., Wank, S.A. 1993. Molecular cloning and functional expression of the pituitary adenylate cyclase activating polypeptide type 1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90** : 6345-6349.

Plonowski, A., Schally, A.V., Busto, R., Krupa, M., Varga, J.L., Halmos, G. 2002. Expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) and splice variants of GHRH receptors in human experimental prostate cancers. *Peptides* **23** : 1127-1133.

Pombo, C.M., Zalvide, J., Gaylinn, B.D., Dieguez, C. 2000. Growth hormone-releasing hormone stimulates mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* **141** : 2113-2119.

Probst, W.C., Snyder, L.A., Schuster, D.J., Borsius, J., Sealfon, S. 1992. Sequence alignment of the G protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell. Biol.* **11** : 1-20.

Rafferty, B., Coy, D.H., Poole, S. 1988. Pharmacokinetic evaluation of superactive analogues of growth hormone-releasing factor (1-29)-amide. *Peptides* **9** : 207-209.

Ray, K.P., Wallis, M. 1988. Regulation of growth hormone secretion and cyclic AMP metabolism in ovine pituitary cells: interactions involved in activation induced by growth hormone-releasing hormone and phorbol esters. *Mol. Cell. Endocrinol.* **58** : 243-252.

Rekasi Z., Czompoly T., Schally A.V., Halmos G. 2000. Isolation and sequencing of cDNAs for splice variants of growth hormone-releasing hormone receptors from human cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97** : 10561-10566.

Rivier, J., Spiess, J., Thorner, M., Vale, W. 1982. Characterization of a growth hormone-releasing factor from a human pancreatic islet tumor. *Nature* **300** : 276-278.

Rocheville, M., Lange, D.C., Kumar, U., Patel, S.C., Patel, R.C., Patel, Y.C. 2000. Receptors for dopamine and somatostatin: formation of hetero-oligomers with enhanced functional activity. *Science* **288** : 154-157.

Roettger, B.F., Pinon, D.I., Burghardt, T.P., Miller, L.J. 1999. Regulation of lateral mobility and cellular trafficking of the CCK receptor by a partial agonist. *Am. J. Physiol.* **276**: C539-547.

Rosenberg, D., Groussin, L., Jullian, E., Perlemoine, K., Bertagna, X., Bertherat, J. 2002. Role of the PKA-regulated transcription factor CREB in development and tumorigenesis of endocrine tissues. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **968** : 65-74.

Rosenthal, W., Seibold, A., Antaramian, A., Lonergan, M., Arthus, M.F., Hendy, G.N., Birnbaumer, M., Bichet, D.G. 1992. Molecular identification of the gene responsible for congenital nephrogenic diabetes insipidus. *Nature* **359** : 233-235.

Rudman, D. 1985. Growth hormone, body composition and aging. *J. Am. Geriatrics Soc.* **33** : 800-807.

Sadeghi, H.M., Innamorati, G., Dagarag, M., Birnbaumer, M. 1997. Palmitoylation of the V2 vasopressin receptor. *Mol. Pharmacol.* **52** : 21-29.

Saermark, T., Jacobsen, C., Magee, A., Vilhardt, H. 1990. Internalization of growth hormone-releasing factor by rat anterior pituitary cells: inhibition by cerulenin, an inhibitor of fatty acid acylation. *J. Mol. Endocrinol.* **4** : 51-59.

Salahpour, A., Angers, S., Bouvier, M. 2000. Functional significance of oligomerization of G-protein-coupled receptors. *Trends Endocrinol. Metab.* **11**: 163-168.

Salvatori, R., Fan, X., Mullis, P.E., Haile, A., Levine, M.A. 2002. Decreased expression of the GHRH receptor gene due to a mutation in a Pit-1 binding site. *Mol. Endocrinol.* **16** : 450-458.

Salvatori, R., Hayashida, C.Y., Aguiar-Oliveira, M.H., Phillips, J.A., Souza, A.H., Gondo, R.G., Toledo, S.P., Conceicao, M.M., Prince, M., Maheshwari, H.G., Baumann, G., Levine, M.A. 1999. Familial dwarfism due to a novel mutation of the growth hormone-releasing hormone receptor gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **84** : 917-923.

Sarret, P., Nouel, D., Dal Farra, C., Vincent, J.P., Beaudet, A., Mazella, J. 1999. Receptor-mediated internalization is critical for the inhibition of the expression of growth hormone by somatostatin in the pituitary cell line AtT-20. *J. Biol. Chem.* **274**: 19294-19300.

Sartin, J.L., Coleman, E.S., Steele, B. 1996. Interaction of cyclic AMP- and calcium-dependent mechanisms in the regulation of growth hormone-releasing hormone-stimulated growth hormone release from ovine pituitary cells. *Domest. Anim. Endocrinol.* **13** : 229-238.

Sassolas, G., Chayvialle, J.A., Partenski, C., Berger, G., Trouillas, J., Berger, F., Claustrat, B., Cohen, R., Girod, C., Guillemin, R. 1983. Acromégalie, expression clinique de la production de facteurs de libération de l'hormone de croissance par une tumeur pancréatique. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **44** : 347-355.

Sato, K., Hotta, M., Kageyama, J., Chiang, T.C., Hu, H.Y., Dong, M.H., Ling, N. 1987. Synthesis and in vitro bioactivity of human growth hormone-releasing factor analogs substituted with a single D-amino acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149** : 531-537.

Schwander, J.C., Hauri, C., Zapf, J., Froesch, E.R. 1983. Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. *Endocrinology* **113** : 297-305.

Schulein, R., Liebenhoff, U., Muller, H., Birnbaumer, M., Rosenthal, W. 1996. Properties of the human arginine vasopressin V2 receptor after site-directed mutagenesis of its putative palmitoylation site. *Biochem. J.* **313** : 611-616.

Segre, G.V., Goldring, S.R. 1993. Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide, vasoactive intestinal peptide, glucagon-like peptide 1, growth hormone-releasing hormone and glucagon belong to a newly discovered G-protein-linked receptor family. *Trends Endocrinol. Metab.* **4** : 309-314.

Seifert, H., Perrin, M., Rivier, J., Vale, W. 1985. Growth hormone-releasing factor binding sites in rat anterior pituitary membrane homogenates: modulation by glucocorticoids. *Endocrinology* **117** : 424-426.

Sekkali, B., Belayew, A., Bortolussi, M., Martial, J.A., Muller, M. 1999. Pit-1 mediates cell-specific and cAMP-induced transcription of the tilapia GH gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* **152** : 111-123.

Shaywitz, A.J., Greenberg, M.E. 1999. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 821-861.

Sheng, M., Thompson, M.A., Greenberg, M.E. 1991. CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science* **252**: 1427-1430.

Shenker, A., Laue, L., Kosugi, S., Merendino, J.J. Jr., Minegishi, T., Cutler, G.B. Jr. 1993. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* **365** : 652-654.

Sirotkin, A.V., Makarevich, A.V. 2002. Growth hormone can regulate functions of porcine ovarian granulosa cells through the cAMP/protein kinase A system. *Anim. Reprod. Sci.* **70** : 111-126.

Smirnova, I.V., Bittel, D.C., Ravindra, R., Jiang, H., Andrews, G.K. 2000. Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1. *J. Biol. Chem.* **275** : 9377-9384.

Sonntag, W.E., Steger, R.W., Forman, L.J., Meites, J. 1980. Decreased pulsatile release of growth hormone in old male rats. *Endocrinology* **107** : 1875-1879.

Spengler, D., Waeber, C., Pantaloni, C., Holsboer, F., Bockaert, J., Seeburg, P.H., Journot, L. 1993. Differential signal transduction by five splice variants of the PACAP receptor. *Nature* **365** : 170-175.

Spiess, J., Rivier, J., Vale, W. 1983. Characterization of rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. *Nature* **303** : 532-534.

Srivastava, C.H., Breyer, P.R., Rothrock, J.K., Peredo, M.J., Pescovitz, O.H. 1993 A new target for growth hormone releasing-hormone action in rat: the Sertoli cell. *Endocrinology* **133** : 1478-1481

Srivastava, C.H., Collard, M.W., Rothrock, J.K., Peredo, M.J., Berry, S.A., Pescovitz, O.H. 1993. Germ cell localization of a testicular growth hormone-releasing hormone- like factor. *Endocrinology* **133** : 83-89.

Stefan, C.J., Blumer, K.J. 1994. The third cytoplasmic loop of a yeast G-protein-coupled receptor controls pathway activation, ligand discrimination, and receptor internalization. *Mol. Cell. Biol.* **14** : 3339-3349.

Struthers, R.S., Vale, W.W., Arias, C., Sawchenko, P.E., Montminy, M.R. 1991. Somatotroph hypoplasia and dwarfism in transgenic mice expressing a non-phosphorylatable CREB mutant. *Nature*. **350** : 622-624.

Suhr, S.T., Rahal, J.O., Mayo, K.E. 1989. Mouse growth hormone-releasing hormone: precursor structure and expression in brain and placenta. *Mol. Endocrinol.* **3** : 1693-1700.

Takahashi, S., Gottschall, P.E., Quigley, K.L., Goya, R.G., Meites, J. 1987. Growth hormone secretory patterns in young, middle-aged and old female rats. *Neuroendocrinology* **46** : 137-142.

Takahashi, T., Okimura, Y., Yoshimura, K., Shigeyoshi, Y., Kaji, H., Abe, H., Chihara, K. 1995. Regional distribution of growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor mRNA in the rat brain. *Endocrinology* **136** : 4721-4724.

Tam, S-P., Lam, K.S.L., Srivastava, G. 1996. Gene expression of hypothalamic somatostatin, growth hormone releasing factor, and their pituitary receptors in hypothyroidism. *Endocrinology* **137** : 418-424.

Tanaka, K., Nagayama, Y., Nishihara, E., Namba, H., Yamashita, S., Niwa, M. 1998. Palmitoylation of human thyrotropin receptor: slower intracellular trafficking of the palmitoylation-defective mutant. *Endocrinology* **139** : 803-806.

Tang, J., Lagacé, G., Castagné, J., Collu, R. 1995. Identification of human growth hormone-releasing hormone receptor splicing variants. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80** : 2381-2387.

Tannenbaum, G.S., Ling, N. 1984. The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm and GH secretion. *Endocrinology*. **115**: 1952-1957.

Thorens, B. 1992. Expression cloning of the pancreatic  $\beta$  cell receptor for the gluco-incretin hormone glucagon-like peptide 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 8641-8645.

Thorner, M.O., Perryman, R.L., Cronin, M.J., Rogol, A.D., Draznin, M., Johanson, A., Vale, W., Horvath, E., Kovacs, K. 1982. Somatotroph hyperplasia: succesful treatment of acromegaly by removal of a pancreatic islet tumor secreting a growth hormone-releasing factor. *J. Clin. Invest.* **70** : 965-974.

Trimble, E.R., Bruzzone, R., Biden, T.J., Meehan, C.J., Andreu, D., Merrifield, R.B. 1987. Secretin stimulates cyclic AMP and inositol trisphosphate production in rat pancreatic acinar tissue by two fully independent mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84** : 3146-3150.

Tsao, P., Zastrow, M.V. 2000. Downregulation of G protein-coupled receptors. *Current Opinion in Neurobiology* **10** : 365-369.

Tsigos, C., Arai, K., Hung, W., Chrousos, G.P. 1993. Hereditary isolated glucocorticoid deficiency is associated with abnormalities of the adrenocorticotropin receptor gene. *J. Clin. Invest.* **92** : 2458-2461.

Usdin, T.B., Mezey, E., Button, D.C., Brownstein, M.J., Bonner, T.I. 1993. Gastric inhibitory polypeptide receptor, a member of the secretin-vasoactive intestinal peptide receptor family, is widely distributed in peripheral organs and the brain. *Endocrinology* **133** : 2861-2870.

Vaccarino F.J., Feifel D., Rivier J., Vale W., Koob G.F. 1986. Centrally administered hypothalamic growth hormone-releasing factor stimulated food intake in free-feeding rats. *Peptides* **9** : 35-38.

Vallee, B.L., Falchuk, K.H. 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol. Rev.* **73** :79-118

van den Ouweland, A.M., Dreesen, J.C., Verdijk, M., Knoers, N.V., Monnens, L.A., Rocchi, M., van Oost, B.A. 1992. Mutations in the vasopressin type 2 receptor gene (AVPR2) associated with nephrogenic diabetes insipidus. *Nat. Genet.* **2** : 99-102.

van Koppen, C.J., Nathanson, N.M. 1991. The cysteine residue in the carboxyl-terminal domain of the m2 muscarinic acetylcholine receptor is not required for receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase. *J. Neurochem.* **57** :1873-1877.

Veliçelebi, G., Patthi, S., Provow, S., Akong, M. 1986. Covalent cross-linking of growth hormone-releasing factor to pituitary receptors. *Endocrinology* **118** : 1278-1283.

Veyrat-Durebex, C., Pomerleau, L., Robert, A., Gaudreau, P. 2002. Internalization and trafficking of the human and rat growth hormone-releasing hormone receptor. *Soumis*

Vilardaga, J.P., di Paolo, E., de Neef, P., Waelbroeck, M., Bollen, A., Robberecht, P. 1996. Lysine 173 residue within the first exoloop of rat secretin receptor is involved in carboxylate moiety recognition of Asp 3 in secretin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **218** : 842-846.

Wajnrajch, M.P., Chua, S.C., Green, E.D., Leibel, R.L. 1994. Human growth hormone-releasing hormone receptor (GHRHR) maps to a YAC at chromosome 7p15. *Mamm. Genome* **5** : 595.

Walker, R.F., Yang, S.W., Bercu, B.B. 1991. Robust growth hormone (GH) secretion in aged female rat co-administered GH-releasing hexapeptide (GHRP-6) and growth hormone-releasing hormone (GRRH). *Life Sci.* **49** : 1499-1504.

West, C.R., Lookingland, K.J., Tucker, H.A. 1997. Regulation of growth hormone-releasing hormone and somatostatin from perfused, bovine hypothalamic slices. III. Reciprocal feedback between growth hormone-releasing hormone and somatostatin. *Domest. Anim. Endocrinol.* **14** : 358-366.

Widmann, C., Dolci, W., Thorens, B. 1996. Desensitization and phosphorylation of the glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor by GLP-1 and 4-phorbol 12-myristate 13-acetate. *Mol. Endocrinol.* **10** :62-75.

Wu, S., Hu, Y., Wang, J.L., Chatterjee, M., Shi, Y., Kaufman, R.J. 2002. Ultraviolet light inhibits translation through activation of the unfolded protein response kinase PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **277** : 18077-18083.

Yamada, Y., Post, S.R., Wang, K., Tager, H.S., Bell, G.I., Seino, S. 1992. Cloning and functional characterisation of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract and kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** : 251-255.

Xu, L., Lavinsky, R.M., Dasen, J.S., Flynn, S.E., McInerney, E.M., Mullen, T.M., Heinzel, T., Szeto, D., Korzus, E., Kurokawa, R., Aggarwal, A.K., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. 1998. Signal-specific co-activator domain requirements for Pit-1 activation. *Nature* **395** : 301-306.

Zeitler, P., Siriwardana, G. 2000. Stimulation of mitogen-activated protein kinase pathway in rat somatotrophs by growth hormone-releasing hormone. *Endocrine* **12**: 257-264.

Zeitler, P., Stevens, P., Siriwardana, G. 1998. Functional GHRH receptor carboxyl terminal isoforms in normal and dwarf (*dw*) rats. *J. Mol. Endocrinol.* **21** : 363-371.

Zhang, J., Obal, F. Jr, Zheng, T., Fang, J., Taishi, P., Krueger, J.M. 1999. Intrapreoptic microinjection of GHRH or its antagonist alters sleep in rats. *J. Neurosci.* **19** : 2187-2194.

Zhang, P., McGrath, B.C., Reinert, J., Olsen, D.S., Lei, L., Gill, S., Wek, S.A., Vatter, K.M., Wek, R.C., Kimball, S.R., Jefferson, L.S., Cavener, D.R. 2002. The GCN2 eIF2 $\alpha$  kinase is required for adaptation to amino acid deprivation in mice. *Mol. Cell. Biol.* **22** : 6681-6688.

Zhu, H., Wang, H., Ascoli, M. 1995. The lutropin/choriogonadotropin receptor is palmitoylated at intracellular cysteine residues. *Mol. Endocrinol.* **9** :141-150.

Zysk, J.R., Cronin, M.J., Anderson, J.M., Thorner, M.O. 1986. Cross-linking of a growth hormone-releasing factor-binding protein in anterior pituitary cells. *J. Biol. Chem.* **261** : 16781-16784.

Zysk, J.R., Gaylinn, B.D., Lyons, C.E., Johnson, B., Eppler, C.M., Baumbach, W.R., Thorner, M.O. 1996. Purification of the human growth hormone-releasing factor receptor with a C-terminal biotinylated affinity ligand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221** : 133-139.